

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 716**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2010 PCT/EP2010/056811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO2010133589**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2010 E 10720771 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2433138**

54 Título: **Método para detectar la infección de una herida**

30 Prioridad:

18.05.2009 EP 09160557

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2017

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT GRAZ (33.3%)
Rechbauerstrasse 12
8010 Graz, AT;
FORSCHUNGSHOLDING TU GRAZ GMBH (33.3%) y
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GÜBITZ, GEORG;
WEHRSCHÜTZ-SIGL, EVA;
HASMANN, ANDREA;
BINDER, BARBARA;
BURNETT, MICHAEL y
SCHINTLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 606 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para detectar la infección de una herida

5 La presente invención se refiere a un método para detectar la infección de una herida.

10 La cicatrización de heridas es el proceso natural del cuerpo de regeneración del tejido epidérmico y dérmico. Un conjunto de acontecimientos celulares y bioquímicos complejos se produce en una cascada estrechamente orquestada para reparar los tejidos dañados, mientras que las fases inflamatoria, proliferativa y de remodelación se superponen en el tiempo. Las acciones coordinadas de las poblaciones de células tanto residentes como migratorias en el ambiente de la matriz extracelular son esenciales para el restablecimiento de la continuidad y la función anatómicas. La cicatrización en heridas agudas requiere la realización coordinada de una diversidad de actividades celulares incluyendo la fagocitosis, la quimiotaxis, la mitogénesis, la síntesis de colágeno y la síntesis de otros componentes de la matriz y debería estar terminada a los 3 meses.

15 Como el proceso de cicatrización de heridas es muy susceptible a la interrupción, diversas causas incluyendo la infección, la edad avanzada, la diabetes y la enfermedad arterial o venosa, conducen a la formación de heridas crónicas que no cicatrizan. A diferencia de una herida aguda, estas heridas crónicas no cicatrizan de manera oportuna ni ordenada. Aunque la ulceración crónica puede afectar a cualquier región anatómica, la localización más frecuente son las extremidades inferiores. La prevalencia estimada de la ulceración de pierna activa en Europa es de al menos el 0,1-0,3 por ciento. Las úlceras secundarias a la hipertensión venosa y la insuficiencia venosa representan casi el 70 % de todas las úlceras de las piernas, contribuyendo la diabetes y la enfermedad arterial a una proporción significativa del resto.

25 La cicatrización de heridas, en general, está regulada por una multiplicidad de moléculas biológicas, incluyendo citocinas, factores de crecimiento y enzimas. En una herida crónica, el proceso normal de cicatrización se altera en uno o más puntos, sobre todo en las fases inflamatorias o proliferativas. Debido a su importancia en el proceso de cicatrización, las alteraciones en los niveles de factores de crecimiento o de enzimas podrían ser responsables de la cicatrización alterada observada en heridas crónicas. En las fases de la cicatrización normal de heridas, la producción y la actividad de las proteasas se regulan estrictamente. Sin embargo, en los fluidos de heridas crónicas, también se ha observado que los niveles de diversas proteasas incluyendo la catépsina G y la elastasa de neutrófilos, que es capaz de degradar la fibronectina, una proteína esencial implicada en la remodelación de la MEC, son significativamente mayores en las heridas crónicas. Además, ciertos factores de crecimiento parecen ser degradados por proteasas, que se secretan principalmente por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

35 Además del desequilibrio de factores de crecimiento y enzimas, la infección bacteriana es una causa muy frecuente de heridas crónicas. Puesto que las bacterias compiten por los nutrientes y el oxígeno con los macrófagos y los fibroblastos, la infección bacteriana puede retrasar o incluso detener la cicatrización normal de heridas. La infección se produce cuando las bacterias logran el dominio sobre los factores sistémicos y locales de resistencia del hospedador. Esto desencadena una respuesta séptica sistémica y también inhibe múltiples procesos implicados en la cicatrización de heridas. Además del número relativo de microorganismos y su patogenicidad, la respuesta del hospedador y factores tales como la inmunodeficiencia, la diabetes mellitus y los fármacos, determinarán si una herida crónica se infecta o muestra signos de retraso en la cicatrización. Además de un aumento de la carga bacteriana, se detectan la formación de biopelículas y la presencia de organismos resistentes a múltiples fármacos en las heridas crónicas.

50 Como la infección no solo da como resultado una fase inflamatoria prolongada, sino que puede causar necrosis adicional de la herida y puede incluso conducir a la muerte como consecuencia de la sepsis, los médicos deben ser capaces de responder a la infección rápidamente. Los métodos actuales para identificar la infección bacteriana se basan principalmente en el juicio del olor y el aspecto de la herida. Solo por expertos (por ejemplo, médicos), es posible identificar la infección en una herida mediante signos como el enrojecimiento, el dolor o el mal olor.

55 En la mayoría de los casos, se toman torundas y los microorganismos se identifican mediante cultivo. Los resultados de este análisis están disponibles solo después de 1-3 días. Adicionalmente, como la contaminación y la colonización de las heridas son bastante normales, la información acerca del tipo de especies presentes en heridas no es un indicio fiable de infección de la herida. Son factores críticos: los altos niveles de contenido bacteriano, bacterias capaces de alterar sus características fenotípicas y genotípicas, la presencia de organismos resistentes a múltiples fármacos y la formación de biopelículas. Además, la virulencia de los patógenos es importante, a saber, la producción de endotoxinas y exotoxinas, que pueden ser muy dañinas para el hospedador. Como el uso de torundas solo puede proporcionar información acerca del tipo de bacterias y acerca del número aproximado de la carga bacteriana, la identificación de especies bacterianas mediante métodos microbiológicos o PCR no es un diagnóstico real de infección. Además, el método es caro y lleva por lo menos tres días.

65 Si se sospecha de infección, los análisis de sangre muy frecuentemente proporcionan una indicación de seguir un tratamiento médico. Además de la determinación de la cantidad de células blancas de la sangre (leucocitos), la concentración de proteína C reactiva (CRP, del inglés *C-reactive protein*) se eleva en caso de infección. La CRP

pertenece a la familia de proteínas de fase aguda y tiene un tiempo de reacción muy corto (12 horas). Las determinaciones de CRP han desplazado ampliamente la determinación de la velocidad de sedimentación globular ya que es menos sensible y tiene un retraso de más de una semana. Sin embargo, los niveles aumentados de CRP por lo general se miden en la sangre lo que requiere la obtención de sangre y el análisis en un laboratorio clínico.

5 En resumen, estos métodos disponibles consumen mucho tiempo y no pueden utilizarse en la atención domiciliaria o para la evaluación rápida durante los cambios de vendaje de heridas. Por otra parte, la inspección del olor y el aspecto de la herida, que podrían indicar infecciones, requiere médicos con experiencia.

10 El documento WO0230478 desvela un sistema indicador, por ejemplo, para apósitos para heridas a base del sustrato de lisozimas quitosano e indicador de color.

15 Por tanto existe una fuerte necesidad de una ayuda de pronóstico rápida para el diagnóstico de la infección de una herida antes de los síntomas clínicos evidentes de infección. Una herramienta de diagnóstico de este tipo permitiría una intervención precoz con un tratamiento adecuado y reduciría la intervención clínica y el uso de antibióticos. Además, dicho método debe ser sencillo y aplicable en la atención domiciliaria, por ejemplo, por las enfermeras. Estos requisitos previos requieren un diagnóstico rápido de alrededor de 10 a 30 minutos. Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y medios para satisfacer la necesidad identificada anteriormente.

20 La presente invención se refiere a un método para detectar la infección de una herida que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra obtenida de una herida con al menos tres sustratos para al menos tres enzimas seleccionadas entre una de las siguientes combinaciones:

25 lisozima, elastasa y catepsina G o
lisozima, elastasa y mieloperoxidasa o
lisozima, catepsina G y mieloperoxidasa, y

30 - detectar la infección de una herida cuando se determina una conversión de los al menos tres sustratos con dichas al menos tres enzimas y dicha conversión aumenta (por ejemplo, al menos al 50 %, preferentemente al menos al 100 %, más preferentemente al menos al 200 %) en comparación con la conversión de dicho sustrato en una herida no infectada.

35 Las heridas que están infectadas por microorganismos como las bacterias o los hongos contienen enzimas específicas en una mayor cantidad en comparación con las heridas no infectadas. En particular, la cantidad de las enzimas lisozima, elastasa, catepsina G y mieloperoxidasa es mayor en las heridas infectadas. Un aumento de la actividad de una, preferentemente dos, o la totalidad de dichas enzimas en una herida indica una infección.

40 La presente invención proporciona un método para un diagnóstico rápido y precoz de la infección de una herida. Esta denominada "herramienta de diagnóstico rápido" se basa en las enzimas presentes en el fluido de una herida que se asocian a una respuesta inflamatoria del cuerpo humano. La aplicación de sustratos apropiados para las enzimas, que se elevan en caso de infección, puede conducir, por ejemplo, a una reacción de color en minutos y permite una estimación muy rápida de la situación de la herida. La invención comprende posibles dispositivos basados en niveles elevados de elastasa, lisozima, catepsina G y mieloperoxidasa como indicadores de una posible
45 infección de la herida.

50 La lisozima (también conocida como muramidasa) es una enzima que comprende 129 residuos de aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 14,7 kDa. La lisozima es un componente de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y el producto de secreción principal de los macrófagos, que se encuentra en las secreciones y los tejidos de mamíferos; y, sin duda, una de las principales enzimas importantes de nuestro sistema inmunitario innato. Debido al hecho de que la enzima destruye las paredes celulares bacterianas mediante la hidrólisis de los 1,4-beta-enlaces entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglicano, habitualmente se la denomina "antibiótico propio del cuerpo". Además de su actividad lítica contra las bacterias grampositivas, la lisozima puede actuar como una opsonina innata no específica mediante la unión a la
55 superficie bacteriana, la reducción de la carga negativa y la facilitación de la fagocitosis de la bacteria antes de que lleguen las opsoninas del sistema inmunitario adquirido. Se describen niveles elevados de lisozima en el suero en el caso de algunas enfermedades; adicionalmente, podrían detectarse niveles elevados de lisozima en muestras de fluido de la herida en caso de infección.

60 En los seres humanos, existen dos genes para la elastasa: la elastasa pancreática (ELA-1) y la elastasa de neutrófilos (ELA-2). La elastasa de neutrófilos (o elastasa de leucocitos LE: EC 3.4.21.37) es una glucoproteína de 30 kD que pertenece a la familia quimotripsina de serina proteasas expresadas por leucocitos polimorfonucleares (PMN). La EN madura, una glucoproteína altamente catiónica, se dirige a gránulos primarios donde se empaqueta con la catepsina G (otra serina proteasa de neutrófilos).

65

La elastasa de neutrófilos intracelular es una molécula efectora clave del sistema inmunitario innato, con una potente actividad antimicrobiana contra bacterias gramnegativas, espiroquetas y hongos. Además de la implicación en el control de patógenos mediante la degradación de la membrana después de la internalización, la elastasa de neutrófilos catalíticamente activa se ha localizado en la membrana plasmática de los neutrófilos maduros después de la liberación de los almacenes intracelulares. Sin embargo, en los sitios inflamatorios, la elastasa de neutrófilos es capaz de evadir la regulación y una vez desregulada puede inducir la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina 6 y la interleucina 8, conduciendo a la destrucción tisular y la inflamación que caracterizan numerosas enfermedades. La elastina, que, junto con el colágeno, determina las propiedades mecánicas del tejido conectivo, tiene la propiedad excepcional del retroceso elástico y desempeña una función estructural importante en los pulmones, las arterias, la piel y los ligamentos. Por tanto, se ha implicado al exceso de la actividad de la LE en varias afecciones patológicas que conducen al deterioro de la organización de la MEC, incluyendo la artritis reumatoide, el enfisema hereditario, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, el enfisema por lesión por isquemia-reperfusión, la fibrosis quística y la progresión tumoral. Pueden observarse niveles de elastasa elevados en el comienzo mismo de la infección y por tanto la presencia de elastasa en el fluido de una herida proporciona una advertencia de etapa temprana de la infección de la herida, antes de que los síntomas clínicos evidentes de infección estén presentes.

La catepsina G es una proteasa que pertenece al grupo de las cisteína proteasas lisosómicas con un tiol de cisteína nucleófilo en una tríada catalítica. Junto con la elastasa de leucocitos humana y la proteinasa 3, la catepsina G es un contenido de gran importancia de los gránulos azurófilos de los neutrófilos y se libera en sitios de inflamación.

La mieloperoxidasa (MPO) es una proteína enzimática peroxidasa (EC 1.11.1.7) de 150 kDa existente como un dímero que consiste en dos cadenas ligeras de 15 kDa y dos cadenas pesadas glucosiladas de peso variable unidas a un grupo prostético hemo. Esta proteína lisosómica se almacena en gránulos azurófilos de los neutrófilos. La MPO produce ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión cloruro (Cl⁻) durante el estallido respiratorio de los neutrófilos. El ácido hipocloroso y los radicales tirosilo son citotóxicos y son capaces de destruir bacterias y otros patógenos. Aunque la destrucción se ve alterada inicialmente en la deficiencia de MPO, pero alcanza niveles normales después de un periodo de tiempo, lo que indica que un mecanismo de destrucción alternativo aparentemente más lento puede asumir el control en los neutrófilos deficientes en MPO, se midió una actividad elevada de MPO en caso de infección en la sangre y los tejidos. Esto parece ser debido al aumento de la infiltración de neutrófilos al sitio infectado.

La invención se basa en reacciones bioquímicas que provocan cambios de color debido a la presencia de cuatro enzimas diferentes en las heridas en niveles elevados en caso de infección. La evaluación de las cuatro enzimas diferentes puede compensar las variaciones en las actividades enzimáticas individuales en los fluidos de heridas potenciando la precisión de la herramienta de diagnóstico.

Con el fin de aumentar la precisión del método de la presente invención, la muestra se pone en contacto con al menos tres, preferentemente al menos cuatro, de dichos sustratos (que comprenden sustrato para la lisozima) permitiendo la determinación de la presencia de al menos tres, preferentemente de las cuatro, enzimas (que comprenden lisozima) de la presente invención.

Los sustratos utilizados en el método de la presente invención son específicos para la lisozima, la elastasa, la catepsina G y/o la mieloperoxidasa. Se desvela el uso de al menos dos de dichos sustratos específicos de enzima con el fin de determinar el aumento de su presencia en comparación con una herida no infectada. Las combinaciones desveladas de los sustratos incluyen sustratos para la lisozima y la elastasa; la catepsina G y la mieloperoxidasa; la lisozima y la catepsina G; la lisozima y la mieloperoxidasa; la elastasa y la catepsina G; la elastasa y la mieloperoxidasa. Son combinaciones de los sustratos de la invención los sustratos para la lisozima, la elastasa y la catepsina G; la lisozima, la elastasa y la mieloperoxidasa; la lisozima, la catepsina G y la mieloperoxidasa. Se desvelan también sustratos para la elastasa, la catepsina G y la mieloperoxidasa.

La muestra obtenida de la herida puede ser el fluido de la herida, un apósito para heridas que comprende fluido de la herida o una torunda que comprende fluido de la herida.

La presencia y la cantidad de las enzimas de la presente invención en la herida pueden determinarse usando directamente el fluido de la herida. Como alternativa pueden usarse apósitos para heridas o torundas que se hayan puesto en contacto con el fluido de la herida.

Con el fin de determinar la presencia de lisozima, elastasa, catepsina G y/o mieloperoxidasa directamente en un apósito para heridas o una torunda, al menos tres sustratos (que comprenden sustrato para la lisozima) se dispersan preferentemente en una matriz de un polímero médicamente aceptable, preferentemente un hidrogel a base de alginato, peptidoglicano y/o ácido poligalacturónico, proporcionados preferentemente en forma de, por ejemplo, una película o perlas y/o unidos a una fibra, en particular a una fibra de un apósito para heridas o una torunda.

Un apósito para heridas, una torunda o una tira de diagnóstico particularmente preferidos pueden comprender un vehículo, una matriz biodegradable, por ejemplo, una película monocapa o multicapa o perlas y una barrera. El

vehículo puede ser un polímero como la poliamida o el polipropileno. Sobre dicho vehículo puede localizarse una matriz biodegradable. Esta matriz puede elaborarse por ejemplo en forma de película (1-5 mm de espesor) o perlas en forma de mono o multicapa (2-8 mm de diámetro).

5 El sustrato de las enzimas, en particular de la lisozima y la elastasa, puede ser un polímero o biopolímero o dispersarse en dichos polímeros que pueden ser degradados por dichas enzimas. Por ejemplo, un polímero de peptidoglicano puede actuar como un sustrato para la lisozima y la elastina como sustrato para la elastasa. El polímero degradable puede comprender al menos un sustrato unido a al menos una molécula marcadora como al menos un colorante que se libera en el curso de la degradación del sustrato. Las películas multicapa (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas) o las perlas pueden comprender una matriz que contiene el sustrato de
10 enzima marcado que está cubierto por sustrato de enzima no marcado. Sobre la matriz de polímero biodegradable se localiza una capa de barrera. Dicha capa de barrera es una membrana no degradable que impide que las sustancias de la matriz biodegradable y el sustrato y los sustratos convertidos se liberen al exterior. Sin embargo, dicha capa de barrera es permeable para los fluidos de la herida.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el sustrato para la lisozima se selecciona entre el grupo que consiste en un peptidoglicano teñido, preferentemente un peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus*, y quitosano teñido, ambos preferentemente teñidos con un colorante de sulfona de vinilo (por ejemplo, Remazol).

20 El sustrato para la elastasa se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida y Cisteamid-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, que está preferentemente unido directamente al vehículo a o a la matriz.

25 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, el sustrato para la catepsina G se selecciona entre el grupo que consiste en N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida y Cisteamid-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, que está preferentemente unido directamente al vehículo a o a la matriz.

30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el sustrato para la mieloperoxidasa se selecciona entre el grupo que consiste en 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico, alcoxisilanurea y otros compuestos como Fast Blue RR modificado con isocianato. Los sustratos pueden inmovilizarse covalentemente en el sistema. El peróxido de hidrógeno puede estar presente como un cosustrato. La integración de celobiosa deshidrogenasa (por ejemplo, celobiosa deshidrogenasa de *Myriococcum thermophilum*), desferrioxamina mesilato y celobiosa de 5 a 500 mM, preferentemente de 10 a 200 mM, en particular 30 mM, como sustratos, da como resultado la producción de peróxido de hidrógeno que es utilizado por la mieloperoxidasa como un cosustrato. Por supuesto también pueden utilizarse otros sistemas enzimáticos que implican otros sustratos para producir peróxido de hidrógeno.
35 La cantidad de los sustratos utilizados puede variar de sustrato a sustrato. Puesto que el método de la presente invención está optimizado para una detección rápida de la infección de una herida, la cantidad de sustrato utilizada depende de la tasa de conversión de la enzima y del entorno (por ejemplo, líquido, apósito para heridas, torunda, etc.) donde se produce la conversión.

40 La cantidad de sustrato y de fluido de la herida que se usan varía adicionalmente del método de detección: fluido, en gel (matriz biodegradable), torunda, apósito para heridas, etc.

45 En un sistema de ensayo líquido, la cantidad del sustrato de elastasa añadido a una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l, varía de 10 a 500 μ l, preferentemente de 20 a 400 μ l, más preferentemente de 50 a 300 μ l, incluso más preferentemente de 80 a 150 μ l, de una solución que comprende sustrato de 0,05 a 5 mM, preferentemente de 0,05 a 2,5 mM, en particular de 0,8 a 1,2 mM. En una realización particularmente preferida de la presente invención se incuban de 4 a 6 μ l, preferentemente 5 μ l, de líquido de una herida con de 90 a 110 μ l, preferentemente 100 μ l, de una solución de sustrato que comprende sustrato de elastasa de 8 a 1,2 mM, preferentemente de 1 mM, preferentemente N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida.

50 En un sistema de ensayo líquido la cantidad de sustrato de catepsina G añadido a una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l, varía de 10 a 500 μ l, preferentemente de 20 a 400 μ l, más preferentemente de 50 a 300 μ l, incluso más preferentemente de 80 a 150 μ l, de una solución que comprende sustrato de 0,1 a 10 mM, preferentemente de 0,5 a 5 mM, en particular, 3 mM. En una realización particularmente preferida de la presente invención se incuban de 4 a 6 μ l, preferentemente 5 ml, de líquido de una herida con de 90 a 110 μ l, preferentemente 100 μ l, de una solución de sustrato que comprende sustrato de catepsina G de 2 a 4 mM, preferentemente 3 mM, preferentemente N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida.

55 En un sistema de ensayo líquido la cantidad de sustrato de mieloperoxidasa añadido a una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l, varía de 10 a 500 μ l, preferentemente de 20 a 400 μ l, más preferentemente de 50 a 300 μ l, incluso más preferentemente de 80 a 150 μ l, de una solución que comprende sustrato de 0,01 a 1 mM, preferentemente de 0,02 a 0,45 mM. En una realización particularmente preferida de la presente invención se incuban de 4 a 6 μ l, preferentemente 5 ml, de líquido de una herida diluido de 1:10 a 1:30, preferentemente 1:20, con de 90 a 110 μ l, preferentemente 100 μ l, de una solución de

60 En un sistema de ensayo líquido la cantidad de sustrato de mieloperoxidasa añadido a una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l, varía de 10 a 500 μ l, preferentemente de 20 a 400 μ l, más preferentemente de 50 a 300 μ l, incluso más preferentemente de 80 a 150 μ l, de una solución que comprende sustrato de 0,01 a 1 mM, preferentemente de 0,02 a 0,45 mM. En una realización particularmente preferida de la presente invención se incuban de 4 a 6 μ l, preferentemente 5 ml, de líquido de una herida diluido de 1:10 a 1:30, preferentemente 1:20, con de 90 a 110 μ l, preferentemente 100 μ l, de una solución de

sustrato que comprende sustrato de mieloperoxidasa de 2 a 4 mM, preferentemente 3 mM, preferentemente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y/o 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta 0,1 mm o compuestos fenólicos naturales como el ácido sináptico, alcoxisilanurea y Fast Blue RR modificado con isocianato.

5 La solución que comprende dichos sustratos puede comprender adicionalmente sacarosa de 0,1 a 0,5 M, preferentemente 0,3 M, y de 1 a 30 μ l, preferentemente 15 μ l de H₂O₂. En lugar de peróxido de hidrógeno, el sistema puede contener una enzima productora de peróxido de hidrógeno a partir de hidratos de carbono tal como glucosa oxidasa u otra oxidasa de hidrato de carbono tal como celobiohidrolasa (CBH).

10 En un sistema de ensayo líquido la cantidad de sustrato de lisozima añadido a una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l, varía de 1 a 25 mg, preferentemente de 5 a 20 mg, más preferentemente de 8 a 10 mg, en una solución que comprende de 1 a 30 ml, preferentemente 15 ml de tampón. En una realización particularmente preferida de la presente invención se incuban de 4 a 6 μ l, preferentemente 5 μ l, de líquido de una herida con de 90 a 110 μ l, preferentemente 100 μ l, de una solución de sustrato que comprende sustrato de lisozima, preferentemente un peptidoglicano, más preferentemente un peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* y quitosano teñido, ambos preferentemente teñidos con un colorante de sulfona de vinilo (por ejemplo, Remazol).

20 En un sistema de ensayo a base de gel para la detección de la actividad de la elastasa y la catepsina G se añaden de 20 a 250 μ l, preferentemente de 50 a 150 μ l, más preferentemente 100 μ l de una solución de sustrato de 0,05 a 25 mM, preferentemente de 0,1 a 20 mM, a una solución de gel a 40 a 50 °C, más preferentemente a 45 °C (que comprende, por ejemplo, agarosa del 1 al 2 %, preferentemente al 1,5 %) que tiene un volumen de 50 a 150 μ l, preferentemente de 100 μ l. A dicho gel se le añade una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l.

25 En un sistema de ensayo a base de gel para la detección de la actividad de la mieloperoxidasa se añade un volumen de 50 a 150 μ l, preferentemente de 100 μ l, de una solución utilizada para el ensayo de líquidos, al mismo volumen de gel calentado como se ha mencionado anteriormente. A dicho gel se le añade una muestra líquida de una herida que tiene un volumen de entre 0,5 y 30 μ l, preferentemente de entre 1 y 15 μ l.

30 En un sistema de ensayo a base de gel para la detección de la actividad de la lisozima se suspenden de 5 a 100 mg, preferentemente de 10 a 75 mg, más preferentemente de 15 a 50 mg de peptidoglicano, preferentemente de *Micrococcus lysodeictikus*, en un gel calentado, preferentemente gel de agarosa (que comprende, por ejemplo, 10 g de agarosa en una concentración de aproximadamente el 1 % p/v). Como alternativa, el peptidoglicano se tiñe con un colorante tal como se describe en el presente documento calentando el peptidoglicano junto con el colorante a aproximadamente 60 a 70 °C. El precipitado puede usarse en el ensayo de la actividad de la lisozima. Como alternativa, el sistema de ensayo a base de gel comprende dos capas de peptidoglicano teñido y sin teñir. En el caso de la degradación del peptidoglicano debida a la actividad de la lisozima, el color cambiaría del amarillo al azul.

35 Los sistemas de ensayo a base de torundas se realizan con las soluciones como se han indicado anteriormente para los sistemas de ensayo a base de líquidos. Las torundas que se usan son capaces de absorber de 0,5 a 20 μ l, preferentemente de 1 a 15 μ l de fluido de una herida.

40 Si el sistema de ensayo se usa como un indicador en apósitos para heridas, las soluciones mencionadas anteriormente se aplican sobre el apósito y se secan o los sustratos de enzimas se unen covalentemente al apósito.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un apósito para heridas o una torunda que comprenden al menos tres sustratos para al menos tres enzimas seleccionadas entre una de las siguientes combinaciones: lisozima, elastasa y catepsina G o lisozima, elastasa y mieloperoxidasa o lisozima, catepsina G y mieloperoxidasa.

50 Un apósito para heridas y una torunda que comprende dichos al menos tres sustratos es particularmente ventajosa porque permite determinar directamente sobre dichos apósito y torunda si una herida está infectada o no. Los sustratos que se usan desarrollan preferentemente un color cuando son convertidos por enzimas presentes en una muestra con la que dichos apósito o torunda se ponen en contacto. Como alternativa, también es posible proporcionar sobre el apósito o torunda otras sustancias capaces de reaccionar con el sustrato convertido.

55 Un apósito para heridas que comprende dichos sustratos y, opcionalmente, medios para detectar la conversión de los sustratos por las enzimas presentes en una herida infectada es particularmente ventajoso ya que permite controlar si una herida cubierta por dicho apósito está infectada o no. En consecuencia, cualquier persona puede decidir cuándo tiene que cambiarse un apósito para heridas.

60 El apósito para heridas o un sistema de diagnóstico, que pueden estar situados en las proximidades de una herida que está en contacto con el fluido de una herida pueden comprender una capa de vehículo, una matriz funcional y una capa de barrera. Pueden utilizarse poliamida enzimáticamente funcionalizada o polipropilenos como capas de vehículo. Para la matriz funcional pueden utilizarse diferentes mezclas de geles, por ejemplo, alginato/agarosa y

gelatina, con sustratos de enzimas incorporados, tales como peptidoglicano o quitosano como sustratos para la lisozima. Por ejemplo, cuando se determina la cantidad de lisozima pueden aplicarse combinaciones de agarosa con diversas cantidades de peptidoglicano que varían de 15 a 50 mg por 10 g de agarosa/gelatina. La capa de barrera puede basarse en una membrana (con un espesor de por ejemplo 0,2 µm) para excluir el sustrato convertido como el material coloreado de los fluidos de una herida tales como los eritrocitos. Una respuesta clara de este sistema a la lisozima y los fluidos de heridas puede obtenerse mediante la medición de un aumento de la transparencia, por ejemplo, a 450 nm. Adicionalmente, en el caso de actividades de lisozima altas, pudo detectarse una liberación del colorante Remazol Brilliant Blue unido covalentemente a peptidoglicano por un cambio de color del sobrenadante a azul, por un cambio de color de la torunda colocada en el sistema a azul o pudo medirse a 600 nm.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el apósito o la torunda comprenden al menos tres (que comprenden el sustrato para la lisozima), en particular cuatro, de dichos sustratos.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, los al menos tres sustratos se dispersan en una matriz de un polímero médicamente aceptable o se unen a una fibra.

Los al menos tres sustratos se seleccionan preferentemente entre el grupo que consiste en un peptidoglicano, preferentemente un peptidoglicano de *Micrococcus lysodeicticus* teñido con un colorante de sulfona de vinilo, N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida, N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta u otros compuestos fenólicos naturales como ácido sináptico, alcoxisilanurea y Fast Blue RR modificado con isocianato, a condición de que se satisfagan los requisitos de las reivindicaciones 1 o 10.

La presente invención se ilustra adicionalmente en el siguiente ejemplo, sin embargo, sin quedar restringida al mismo.

Ejemplos

Ejemplo 1: ensayo a base de elastasa - sistema líquido

Preparación de sistema de diagnóstico

Se pipetea 100 µl de una solución de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida disuelta a una concentración de 20 mM en DMSO en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M) en un tubo eppendorf transparente. La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida puede ser de entre 0,05 a 2,50 mM y es preferentemente de entre 0,80 y 1,20 mM.

Diagnóstico

Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente de entre 4 a 6 µl y se mezclan por agitación manual durante 10 segundos. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color de rosa claro a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

Se incubaron 5 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 1A que contenía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida 1,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 10 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo	Actividad de la elastasa* U/ml
A	sí	amarillo	sí	3,5
B	sí	amarillo	sí	3,4
C	sí	amarillo	sí	4,1
D	no	sin cambio de color	no	0,4
E	no	sin cambio de color	no	0,3
F	no	sin cambio de color	no	0,4

* medido con un ensayo convencional a base de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida

Ejemplo 2: ensayo a base de elastasa – sistema a base de gel

Preparación del sistema de diagnóstico

- 5 Se disuelve N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida a una concentración de 20 mM en dimetoxisulfóxido y se diluyeron en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M). La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida puede ser de entre 0,2 a 15 mM y es preferentemente de entre 0,50 y 5,00 mM. Se mezclan apropiadamente 100 µl de esta solución con el volumen igual de solución de agarosa caliente (45 °C) (1,5 % p/v) y se transfieren a pocillos de una placa de 96 pocillos.

10 *Diagnóstico*

- 15 Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente de entre 4-6 µl. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

- 20 Se incubaron 5 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito 1B que contenía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida 5,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 10 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	amarillo	sí
B	sí	amarillo	sí
C	sí	amarillo	sí
D	no	sin cambio de color	no
E	no	sin cambio de color	no
F	no	sin cambio de color	no

25 Ejemplo 3: ensayo a base de elastasa - sistema a base de torundas

Preparación del sistema de diagnóstico

- 30 Se disuelve N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida a una concentración de 20 mM en dimetoxisulfóxido y se diluyen en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M). La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida puede ser de entre 0,2 a 10 mM y es preferentemente de entre 0,50 y 5,00 mM. Se pipetearon 40 µl de esta solución en placas de microtitulación.

35 *Diagnóstico*

- 40 Se sumergen torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibra de PES de poliéster (Microjet S1000) en fluido de una herida adsorbiendo de este modo entre 1 y 12 µl de líquido de una herida, preferentemente de entre 5 y 8 µl. El sistema de ensayo después se coloca en placas de microtitulación que contienen la solución de sustrato y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color de la torunda (es decir, el tejido de poliéster) a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

- 45 Usando torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibra de PES de poliéster (Microjet S1000) se tomaron muestras de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) y se colocaron en el sistema de diagnóstico descrito en 1C que contenía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida 1,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 10 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	amarillo	sí
B	sí	amarillo	sí
C	sí	amarillo	sí
D	no	sin cambio de color	no
E	no	sin cambio de color	no

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
F	no	sin cambio de color	no

Ejemplo 4: ensayo a base de catepsina - sistema líquido

5 *Preparación del sistema de diagnóstico*

Se disuelve N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida a una concentración de 20 mM en dimetoxisulfóxido y se diluyeron en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M). La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida puede ser de entre 0,5 a 5 mM y es preferentemente de 3 mM.

10

Diagnóstico

Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente entre 4-6 µl y se mezclan mediante agitación manual. Esta mezcla se incuba a 37 °C durante 10 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

15

Protocolo de ensayo y resultados:

20 Se incubaron 5 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 1A que comprendía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida 3,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 10 a 15 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con Catepsina G*	U/ml
A	sí	amarillo	sí	40
B	sí	amarillo	sí	36
C	sí	amarillo	sí	45
D	no	sin cambio de color	no	3
E	no	sin cambio de color	no	2,5
F	no	sin cambio de color	no	3,5

* medido con un ensayo convencional a base de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida

25

Ejemplo 5: ensayo a base de catepsina - sistema a base de gel

Preparación del sistema de diagnóstico

30 Se disuelve N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida a una concentración de 20 mM en dimetoxisulfóxido y se diluyeron en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M). La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida puede ser de entre 0,5 a 10 mM y es preferentemente de 5,00 mM. Se mezclan apropiadamente 100 µl de esta solución con el volumen igual de solución de agarosa caliente (45 °C) (1,5 % p/v) y se transfieren a pocillos de una placa de 96 pocillos.

35

Diagnóstico

Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente de entre 4-6 µl. Esta mezcla se incuba a 37 °C durante 10 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

40

Protocolo de ensayo y resultados:

45 Se incubaron 5 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito 1B que contenía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida 5,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 10 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

50

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	amarillo	sí
B	sí	amarillo	sí
C	sí	amarillo	sí
D	no	sin cambio de color	no
E	no	sin cambio de color	no
F	no	sin cambio de color	no

Ejemplo 6: ensayo a base de catepsina - sistema a base de torundas

5 *Preparación del sistema de diagnóstico*

Se disuelve N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida a una concentración de 20 mM en dimetoxisulfóxido y se diluyen en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M). La concentración final de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida puede ser de entre 0,5 a 10 mM y es preferentemente de 5,00 mM. Se pipetearon 40 µl de esta solución en placas de microtitulación.

Diagnóstico

Se sumergen torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibras de PES de poliéster (Microjet S1000) en fluido de una herida adsorbiendo de este modo entre 1 y 12 µl de líquido de una herida, preferentemente de entre 5 y 8 µl. El sistema de ensayo después se coloca en placas de microtitulación que contienen la solución de sustrato y se incuban a 37 °C durante 15 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color de la torunda (es decir, el tejido de poliéster) a amarillo. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

Usando torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibras de PES de poliéster (Microjet S1000) se tomaron muestras de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) y se colocaron en el sistema de diagnóstico descrito en 1C que contenía una concentración de sustrato de N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida 5,0 mM. La inspección visual de las muestras después de 15 minutos de incubación indicó un cambio de color a amarillo solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	amarillo	sí
B	sí	amarillo	sí
C	sí	amarillo	sí
D	no	sin cambio de color	no
E	no	sin cambio de color	no
F	no	sin cambio de color	no

30 Ejemplo 7: ensayo a base de mieloperoxidasa - sistema líquido

Preparación del sistema de diagnóstico

Para esta herramienta de diagnóstico, pueden utilizarse dos sustratos diferentes, a saber, TMB o ABTS. Se utilizaron 3350 µl de tampón succinato (pH 5,4) que contenía sacarosa 0,3 M, se añadieron 15 µl de H₂O₂ 1 % y 7 µl de los sustratos (ABTS 5-40 mM, TMB 20-150 mM, cristal violeta 0,0128 mM y Fast Blue RR modificado 0,025 mM). Se disolvieron en primer lugar TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) en N,N-metilformamida, cristal violeta, leuco cristal violeta y RR Fast Blue modificado en etanol, mientras que el ABTS puede disolverse en agua. Se pipetearon 100 µl de las soluciones en un tubo eppendorf transparente.

Diagnóstico

Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente de entre 4-6 µl y se mezclan por agitación manual durante 10 segundos. Esta mezcla se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color de incoloro a azul (TMB) o verde (ABTS), respectivamente. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

5 Se diluye fluido de herida de muestras infectadas y no infectadas 1:20. Se incuban 5 µl de estas diluciones de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 1A que contiene los dos sustratos diferentes. La inspección visual de las muestras después de 5 minutos de incubación indicó un cambio de color a azul en caso de TMB solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo	Actividad de MPO* U/ml
A	sí	azul	sí	190
B	sí	azul	sí	160
C	sí	azul	sí	175
D	no	sin cambio de color	no	5
E	no	sin cambio de color	no	12
F	no	sin cambio de color	no	17

* medido con un ensayo convencional a base de Guayacol

10 *Ejemplo 8: ensayo a base de mieloperoxidasa - sistema de gel*

Preparación del sistema de diagnóstico

15 Para esta herramienta de diagnóstico, pueden utilizarse dos sustratos diferentes, a saber, TMB o ABTS. Se utilizaron 3350 µl de tampón succinato (pH 5,4) que contenía sacarosa 0,3 M, se añadieron 15 µl de H₂O₂ 1 % y 7 µl de los sustratos (ABTS 5-40 mM, TMB 20-150 mM, cristal violeta 0,0128 mM, leuco cristal violeta 0,1 mM y Fast Blue RR modificado 0,025 mM). Se disolvió en primer lugar TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) en N,N-metilformamida, mientras que el ABTS puede disolverse en agua. Se mezclaron apropiadamente 100 µl de esta solución con el volumen igual de solución de agarosa calentada (45 °C) (1,5 % p/v) y se transfirieron a pocillos de una placa de 96 pocillos.

Diagnóstico

25 Un volumen de entre 1 y 15 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo, preferentemente de entre 4-6 µl. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color a azul y verde, respectivamente. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

30 Se diluyeron 5 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 1B que contenían los dos sustratos para MPO. La inspección visual de las muestras después de 5 minutos de incubación indicó un cambio de color a azul o verde para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

35 *Ejemplo 9: ensayo a base de mieloperoxidasa - sistema a base de torundas*

Preparación del sistema de diagnóstico

40 Se utilizaron 3350 µl de tampón succinato (pH 5,4) que comprendía sacarosa 0,3 M, se añadieron 15 µl de H₂O₂ 1 % y 7 µl de los sustratos (ABTS 20 mM, TMB 100 mM, cristal violeta 0,0128 mM, leuco cristal violeta 0,1 mM y Fast Blue RR modificado 0,025 mM). Se pipetearon 40 µl de esta solución en placas de microtitulación.

Diagnóstico

45 Se sumergen torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibra de PES de poliéster (Microjet S1000) en fluido de una herida diluido 1:20 adsorbiendo de este modo entre 1 y 12 µl de líquido de una herida, preferentemente de entre 5 y 8 µl. El sistema de ensayo después se coloca en placas de microtitulación que contienen la solución de sustrato y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un cambio de color de la torunda (es decir, el tejido de poliéster) a azul o verde, respectivamente. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán de color.

Protocolo de ensayo y resultados:

5 Usando torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibra de PES de poliéster (Microjet S1000) se tomaron muestras de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) diluidas 1:20 y se colocaron en el sistema de diagnóstico descrito en 1B que contenía los sustratos TMB. La inspección visual de las muestras después de 5 minutos de incubación indicó un cambio de color a azul solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	azul	sí
B	sí	azul	sí
C	sí	azul	sí
D	no	sin cambio de color	no
E	no	sin cambio de color	no
F	no	sin cambio de color	no

10 Ejemplo 10: ensayo a base de lisozima - sistema líquido

Preparación del sistema de diagnóstico

15 Una cantidad entre 1 y 15 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* se suspende en 15 ml de tampón de KH₂PO₄ 0,1 M (pH 7,0). Preferentemente, se suspende una cantidad de entre 8 y 10 mg. Se pipetea 290 µl de esta solución en un tubo eppendorf transparente.

Diagnóstico

20 Un volumen de 10 µl de fluido de una herida se añade al sistema de ensayo y se mezclan por agitación manual durante 10 segundos. Esta mezcla se incuba a 37 °C durante 15 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por una disminución de la turbidez. Las mezclas que contienen muestras de heridas no infectadas no cambiarán.

25 *Protocolo de ensayo y resultados:*

30 Se incubaron 10 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 2A que contenía *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato para la lisozima. La inspección visual de las muestras después de 15 minutos de incubación a 37 °C indicó un cambio de turbidez solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta al ensayo	Infección de acuerdo con el ensayo	Actividad de lisozima* U/ml
A	sí	transparente	sí	1200
B	sí	transparente	sí	974
C	sí	transparente	sí	1800
D	no	turbio	no	210
E	no	turbio	no	205
F	no	turbio	no	320

* medido con peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato

Ejemplo 11: ensayo a base de lisozima – sistema a base de gel

35 *Preparación del sistema de diagnóstico*

40 Se suspenden de 15 a 50 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* en 10 g de agarosa (1 % p/v) que se disuelven en tampón de fosfato 0,1 M pH 7,0 y se calentaron en el microondas. La solución se mezcla apropiadamente y se transfiere a pocillos de una placa de 96 pocillos. En un segundo ensayo, se tiñe el peptidoglicano (*Micrococcus lysodeikticus*) con Remazol Brilliant Blue (RBB). Por tanto, se suspenden 50 mg de peptidoglicano en 0,5 ml de solución de Remazol Brilliant Blue (0,5 % p/v) y se diluyen con el mismo volumen de solución de tinción (NaSO₄ al 2,5 % p/v). Después del gradiente térmico se utiliza: 25 °C durante 10 minutos, 65 °C durante 5 minutos. Después de la centrifugación durante 4 minutos a 13000 rpm, se realizan varias etapas de lavado hasta que el sobrenadante es incoloro. En un tercer ensayo, se utilizan dos capas de peptidoglicano teñidas y sin teñir, mientras que el peptidoglicano teñido se aplica como se ha descrito anteriormente (sistema de doble capa). Además, se utiliza una matriz que comprende el 80 % de agarosa al 1 % y el 20 % de gelatina al 2 %, elastina, fibronectina y colágeno respectivamente.

Diagnóstico

Se añade un volumen de 100 µl de fluido de la herida al sistema de ensayo. Esta mezcla se incuba a 37 °C entre 15 y 60 minutos. La digestión del peptidoglicano, debida a la actividad de la lisozima conduce a un aumento de la transparencia que puede medirse a 450 nm y que puede verse claramente en el caso de las heridas infectadas. En el caso del peptidoglicano teñido, el colorante se libera en el sobrenadante, que vuelve a ser azul en el caso de las heridas infectadas. En el caso del sistema de doble capa, el sistema cambia de color de amarillo a azul, lo que puede verse fácilmente después de la incubación durante al menos 30 minutos.

10 *Protocolo de ensayo y resultados:*

Se incubaron 100 µl de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) con el sistema de diagnóstico descrito en 2B que contenía peptidoglicano como sustrato para la lisozima. La inspección visual de las muestras después de 15 y 60 minutos de incubación indicó un cambio en la transparencia solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Muestra de herida	Infección de acuerdo con el diagnóstico de médicos	Respuesta del ensayo al sistema sin teñir	Respuesta del ensayo al sistema teñido	Respuesta del ensayo al sistema de doble capa	Infección de acuerdo con el ensayo
A	sí	transparente	azul	azul	sí
B	sí	transparente	azul	azul	sí
C	sí	transparente	azul	azul	sí
D	no	turbio	transparente	amarillo/blanco	no
E	no	turbio	transparente	amarillo/blanco	no
F	no	turbia	transparente	amarillo/blanco	no

Ejemplo 12: ensayo a base de lisozima - sistema a base de torundas

20 *Preparación del sistema de diagnóstico*

Se suspenden de 15 a 50 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* teñidos con Remazol Brilliant Blue (RBB) en 10 g de agarosa (1 % p/v) disuelta en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 y calentada en el microondas. La solución se mezcla apropiadamente y se transfiere a pocillos de una placa de 96 pocillos.

25 *Diagnóstico*

Se sumergen torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibras de PES de poliéster (Microjet S1000) en fluido de una herida adsorbiendo de este modo entre 1 y 12 µl de líquido de una herida, preferentemente de entre 5 y 8 µl. La torunda después se aclara en solución tampón y esta solución después se coloca en las placas de microtitulación que contienen el sistema a base de gel con el peptidoglicano teñido. El sistema después se incuba a 37 °C durante 30 minutos. A partir de entonces, la infección de la herida se indicará por un sobrenadante azul/el cambio de los tejidos a azul en el caso de heridas infectadas.

35 *Protocolo de ensayo y resultados:*

Usando torundas pequeñas (0,5 × 0,5 cm) de una microfibras de PES de poliéster (Microjet S1000) se tomaron muestras de muestras de heridas infectadas (A, B, C) y no infectadas (D, E, F) y se colocaron en el sistema de diagnóstico descrito anteriormente que contenía el sistema a base de gel con peptidoglicano teñido con remazol. La inspección visual del sobrenadante/los tejidos después de 30 minutos de incubación indicó el desarrollo de un color azul solo para las muestras de heridas infectadas A, B y C.

Ejemplo 13: Combinación de enzimas – sistema líquido

45 *Preparación del sistema de diagnóstico*

Se prepararon 100 µl de los sustratos líquidos descritos para las enzimas elastasa, mieloperoxidasa y catepsina G (véanse los ejemplos 1 a 10) y se transfirieron a una placa de microtitulación.

50 *Diagnóstico*

Se añaden 5 µl de fluidos de herida de las heridas infectadas (A-F) y las heridas no infectadas (G-L). El fluido de la herida puede tomarse con un capilar o una jeringuilla y después se divide en alícuotas. Como alternativa, se utilizan torundas para transferir muestras de heridas infectadas (A-F) y heridas no infectadas (G-L) a 1-2 ml de solución tampón. Se añadieron alícuotas de 250 µl (500 µl) a la placa de microtitulación con los cuatro sustratos de enzimas diferentes.

ES 2 606 716 T3

5 Las placas se incuban a 37 °C. Después de 10 minutos, se inspeccionó el ensayo de elastasa y se volvió amarillo en el caso de las heridas infectadas. Después de 30 minutos se inspeccionaron el ensayo de la catepsina G y el de la lisozima e indicaron infección volviéndose de color amarillo, azul y transparente, respectivamente. Después de 5 minutos, se inspeccionaron dos ensayos de MPO (TMB y ABTS) e indicaron infección volviéndose de color azul y verde, respectivamente. Después de 60 minutos, se inspeccionó el ensayo de MPO usando cristal violeta, leuco cristal violeta y Fast Blue RR modificado e indicó infección mediante el cambio del color.

10 La muestra A muestra un desarrollo de color menos pronunciado en el ensayo de elastasa, pero fue claramente positiva en los otros ensayos. Por el contrario, las muestras D y E muestran un desarrollo de color menos pronunciado en el ensayo de MPO con ABTS mientras que fueron positivas en los otros ensayos. Esto confirma la importancia de la combinación de al menos 2, preferentemente 3, mucho más preferentemente 4, ensayos diferentes para la herramienta de diagnóstico.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la infección de una herida que comprende las etapas de:
- 5 - poner en contacto una muestra obtenida de una herida con al menos tres sustratos para al menos tres enzimas seleccionadas entre una de las siguientes combinaciones:
- 10 lisozima, elastasa y catepsina G o
 lisozima, elastasa y mieloperoxidasa o
 lisozima, catepsina G y mieloperoxidasa, y
- detectar la infección de una herida cuando se determina una conversión de los al menos tres sustratos con dichas al menos tres enzimas.
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra se pone en contacto con al menos cuatro de dichos sustratos.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la muestra es fluido de una herida, un apósito para heridas que comprende fluido de una herida, una torunda que comprende fluido de una herida.
- 20 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dichos sustratos se dispersan en una matriz de un polímero médicamente aceptable, preferentemente un hidrogel.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dichos sustratos están unidos a una fibra, en particular a una fibra de un apósito para heridas o una torunda.
- 25 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el sustrato para la lisozima se selecciona entre el grupo que consiste en un peptidoglicano, preferentemente un peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* teñido con un colorante de sulfona de vinilo.
- 30 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el sustrato para la elastasa se selecciona entre el grupo que consiste en N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida y Cisteamid-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-pNA.
- 35 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el sustrato para la catepsina G se selecciona entre el grupo que consiste en N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida y Cisteamid-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.
- 40 9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el sustrato para la mieloperoxidasa se selecciona entre el grupo que consiste en 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico y Fast Blue RR modificado con Isocianato.
- 45 10. Apósito para heridas o torunda que comprende al menos tres sustratos para al menos tres enzimas seleccionadas entre una de las siguientes combinaciones:
- 50 lisozima, elastasa y catepsina G o
 lisozima, elastasa y mieloperoxidasa o
 lisozima, catepsina G y mieloperoxidasa,
- siendo dichos sustratos capaces de liberar un agente coloreado o de provocar el desenturbiamiento.
11. Apósito para heridas o torunda de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizados porque el apósito o torunda comprende al menos cuatro de dichos sustratos.
- 55 12. Apósito para heridas o torunda de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, caracterizados porque dichos sustratos se dispersan o se unen covalentemente a una matriz de un polímero médicamente aceptable o se unen a una fibra.
- 60 13. Apósito para heridas de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque dichos sustratos se seleccionan entre el grupo que consiste en un peptidoglicano, preferentemente un peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* teñido con un colorante de sulfona de vinilo, N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida, N-metoxisuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico y Fast Blue RR modificado con Isocianato.