

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 612**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/GB2011/001665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11805905 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2646566**

54 Título: **Una composición para detectar biofilms en tejidos viables**

30 Prioridad:

30.11.2010 GB 201020236

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

21.04.2017

73 Titular/es:

**CONVATEC TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
3993 Howard Hughes Parkway, Suite 250
Las Vegas, Nevada 89169, US**

72 Inventor/es:

**BOWLER, PHILLIP GODFREY;
METCALF, DANIEL GARY;
PARSONS, DAVID y
JOHNSON, EMILY SONIA**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 609 612 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

Una composición para detectar biofilms en tejidos viables.

5 Esta invención se refiere a una composición que puede aplicarse a tejidos viables tales como heridas crónicas (v.g. úlceras de las piernas, úlceras de presión, úlceras de pie diabético), heridas agudas (v.g. cortes, abrasiones, quemaduras), piel y hueso para la detección de biofilms microbianos como un indicador precoz de alarma para tejido en riesgo de infección. Más particularmente, la invención se refiere a una composición capaz de producir biofilms en tejidos viables observables al mismo tiempo que se evitan la irritación de la herida y la piel y el retardo de la curación.

10 Los tejidos viables están colonizados a menudo por una diversidad de microorganismos, algunos de los cuales pueden causar infección. Está siendo cada vez más aceptado que la curación de heridas crónicas y agudas se ve dificultada por la presencia de microorganismos que colonizan la herida. Está surgiendo una evidencia convincente de que estos microorganismos pueden existir en las heridas fundamentalmente en forma de biofilms. Durante la colonización, bacterias y otros microorganismos tales como levaduras y hongos, se fijan firmemente al tejido y forman biofilm por la secreción de una matriz extracelular de sustancias polímeras. Este modo de crecimiento imparte cierto grado de protección a los microorganismos dentro del biofilm en forma de protección física contra los agentes antimicrobianos tópicos y sistémicos debido a la matriz circundante. Se cree también que los microorganismos en el interior de los biofilms tienen fenotipos y genotipos alterados comparados con sus homólogos planctónicos que nadan libremente. Es sabido que los microorganismos del biofilm son menos activos metabólicamente y, debido a ello, pueden proporcionar también cierto grado de resistencia a los métodos antimicrobianos tradicionales tales como los antibióticos, que se sabe actúan contra las bacterias metabólicamente activas. Adicionalmente, la presencia de biofilms en las heridas inhibe también el sistema inmune del hospedador en el aclaramiento de los microbios inflamatorios, y las fases de granulación y re-epitelialización, del proceso normal de curación de las heridas.

25 Como consecuencia, existe necesidad de desarrollar métodos o dispositivos que detecten rápidamente la presencia de biofilm en los tejidos viables antes y después de protocolos de tratamiento seleccionados. Esto podría ayudar a los investigadores a comprender si existen microorganismos vivos en el estado del biofilm en la piel y las heridas, y permitir a los mismos seguir la maduración o aclaramiento de tales comunidades de biofilm. Un método o dispositivo de detección de biofilm podría permitir también que los investigadores desarrollen estrategias anti-biofilm eficaces y protocolos de cuidado eficaces para curación de las heridas, y en la práctica clínica, podría guiar la selección de vendajes apropiados de las heridas y ayudar a la monitorización de la eficacia de un protocolo de tratamiento dado por el profesional de cuidado de las heridas. Los biofilms están constituidos típicamente por bacterias encerradas dentro de una sustancia (o matriz) exopolímera que consiste en polisacáridos de cadena larga con β -enlaces complejos tales como enlaces hexosa unidos en 1,3 ó 1,4 (ejemplos de algunos polisacáridos comunes de biofilm son ácido teicoico, piruvato enlazados a cetol, N-acetil-glucosamina, y los ácidos urónicos: ácidos D-gulurónico, D-galacturónico y manurónico), proteína (algunas de las cuales pueden jugar un papel estructural), DNA (extracelular, algunos de los cuales pueden tener un papel estructural), lípidos, iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , etc.) y agua. Los biofilms pueden estar asociados también con tejidos desvitalizados del hospedador tales como escara y tejido necrótico.

40 A las sustancias polímeras extracelulares (EPS) del biofilm se hace referencia también como matriz extracelular del biofilm o tejido derivado de bacterias. Mientras que el biofilm es principalmente agua en peso y las bacterias pueden constituir sólo 10-20% del biofilm, el EPS constituye la mayor parte de la biomasa/peso seco del biofilm.

45 biofilms tales como los encontrados en los dientes en la forma de placa dental, son a menudo fáciles de visualizar a simple vista debido a su grosor y su color y a la naturaleza del sustrato sobre el que se forman. La visualización del biofilm en, por ejemplo, una herida crónica o aguda no es simple debido a los colores presentes en la herida y los contenidos de la herida. Las heridas crónicas y agudas son usualmente complejas en el sentido de que contienen tejido muerto o desvitalizado (escara), exudado, pus, sangre, medicamentos, componentes del vendaje, además de bacterias y biofilm. Por ello, puede ser difícil detectar la presencia de un biofilm en una herida, dado que la visualización de los biofilms de la herida a simple vista es difícil. Por tanto, existe necesidad de un medio para ayudar a la detección del biofilm, por ejemplo por una composición que sea capaz de teñir preferentemente los biofilms de heridas de tal modo que los mismos puedan ser visualizados. Una vez visualizado, el biofilm puede tratarse de modo adecuado. Sorprendentemente, se ha encontrado que es posible teñir preferentemente los biofilms por el uso de una composición que comprende un tinte que permite la detección del biofilm.

Composiciones para tinción de biofilms se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO 2010/070292 A1; sin embargo, las composiciones descritas se encuentran predominantemente en forma de gel.

60 De acuerdo con ello, un primer aspecto de la invención proporciona una composición líquida de tinción para uso en la producción de biofilm en tejido viable detectable según las reivindicaciones adjuntas, en donde la composición tiñe preferentemente el biofilm. Con preferencia, el biofilm se hace detectable a simple vista o en asociación con iluminación y/o dispositivos ópticos.

65 El agente de tinción es Rosa Bengala.

5 Por la expresión “tiñe preferentemente se entiende que el agente de tinción se fija selectivamente al biofilm en lugar de fijarse al tejido viable del hospedador. De esta manera, el agente de tinción puede utilizarse simplemente para detectar el biofilm por revelado de la presencia y localización del biofilm. El agente de tinción queda fijado o adsorbido a las moléculas de la matriz del biofilm extracelular además de fijarse o adsorberse a y/o ser capturado por las células bacterianas del biofilm en lugar de tejido de la herida. Preferiblemente, la tinción del biofilm por el agente de tinción revela la presencia de biofilm por hacerlo detectable a simple vista. Alternativamente, puede hacerse que el biofilm teñido emita fluorescencia, por ejemplo por iluminación con una fuente luminosa. La fluorescencia puede hacer más visible el biofilm teñido. La fuente luminosa se selecciona de modo que emita luz de una longitud de onda apropiada tal que el agente de tinción absorbe energía luminosa en la forma de fotones que excitan el agente de tinción y causan que el mismo emita fluorescencia. La observación de la fluorescencia puede mejorarse utilizando filtros ópticos apropiados que excluyen las longitudes de onda no fluorescentes del agente de tinción, por ejemplo en la forma de lentes provistas de filtros ópticos.

15 Las composiciones según un primer aspecto de la invención comprenden Rosa Bengala como el agente de tinción capaz de teñir preferentemente los biofilms.

El agente de tinción se incluye preferiblemente en la composición a un nivel que oscila desde 0,0001% a 1% en peso, más preferiblemente 0,0025% a 0,025% en peso, y aún más preferiblemente 0,0025% a 0,01% en peso.

20 Las composiciones de la presente invención pueden encontrarse en una forma que se adhiere ligeramente a los tejidos y pueden eliminarse fácilmente por lavado después de un breve periodo de tiempo para ayudar a la visualización del biofilm teñido. Por ejemplo, una solución líquida basada en agua o glicerol (en la forma de un aplicador, nebulizador u hoja), podría proporcionar contacto íntimo con un lecho de herida. En cualquier sistema de suministro de este tipo, la formulación debería eliminarse preferiblemente con facilidad de los tejidos viables por lavado utilizando un irrigador estándar tal como solución salina, durante unos cuantos segundos.

30 La composición de la invención puede comprender también un humectante tal como propilenglicol (PG), glicerol, polietilenglicol, povidona, sorbitol, trietanolamina, ciclometicona, lactato de amonio o glicerol-éster. Preferiblemente, la composición comprende desde 5% a 15% en peso de un humectante, y muy preferiblemente PG.

35 La composición de la invención comprende excipientes para optimizar la fijación del tinte al biofilm, a saber, sal tetrasódica de ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA) a un nivel de 0,1 a 2,0% en peso, y un agente para ayudar a la penetración del agente de tinción en el biofilm, a saber, el surfactante cloruro de benzalconio (BaCl) o cloruro de bencetonio (BeCl) a un nivel de 0,1 a 1,0% en peso. La adición de un surfactante puede actuar también como agente espumante.

40 Preferiblemente, la composición de la invención tiene un pH comprendido en el intervalo de 5 a 7, y muy preferiblemente alrededor de 5,5. Con preferencia, la composición de la invención se encuentra la forma de una solución aplicada a la herida desde una jeringuilla, bolsita, frasco de nebulización, frasco de aerosol, frasco dispensador sin propelente, pincel u hoja de gel, film u oblea que se disuelve.

45 La formulación podría esterilizarse finalmente por tratamiento en autoclave o irradiación gamma. Alternativamente, la formulación podría ser una solución preservada que contenga por ejemplo conservantes tales como DMDM-hidantoína o parabenos tales como metil-, etil- o propil-parabén.

50 La composición de la presente invención se utilizará fundamentalmente en tejidos viables que muestren signos de infección clínica (inflamación, olor desagradable, exudado purulento, hipoxia, etc.), puedan encontrarse en riesgo de infección, parezcan encontrarse en presencia de escara (tejido derivado del hospedador) o biofilm (tejido derivado de bacterias), o sean reacios en general. La composición podría utilizarse también en caso de cambio de vendaje, a fin de detectar biofilm, y también para monitorizar la eficacia del régimen de tratamiento y dirigir el tratamiento futuro por reducción en el biofilm detectado.

55 En un ejemplo de uso típico, una composición según la invención se aplica a toda la herida o a regiones deseadas a fin de conseguir una capa de composición fina pero consistente, por ejemplo de 0,1 a 0,5 cm de grosor. La composición se deja in situ durante 0,1 a 15 min, más preferiblemente 0,5 a 2 min. Antes de cualquier iluminación, la formulación puede dejarse in situ, o más preferiblemente el exceso de formulación se elimina por lavado de la herida utilizando una solución de irrigación de heridas adecuada. La eliminación del exceso de formulación por lavado puede permitir que la tinción muestre dónde se encuentra el biofilm en la herida, a fin de que estas áreas puedan tratarse por ejemplo mediante raspado.

60 La herida se examina luego en cuanto a la presencia de biofilm teñido preferentemente. Esto puede hacerse a simple vista, o la herida puede iluminarse con una fuente luminosa a una distancia comprendida en el intervalo de 1 a 50 cm. Con preferencia, la fuente luminosa se encuentra a una distancia de 5 a 20 cm. La señal espectral de la fuente luminosa se selecciona de modo que corresponda al espectro de emisión de fluorescencia del agente de tinción; a saber, para Rosa Bengala, que tiene un máximo de fluorescencia de 575 nm, una fuente luminosa adecuada podría emitir longitudes de onda de 550-600 nm. Esto causa que el agente contenido en el biofilm teñido emita fluorescencia. Preferiblemente, el

usuario lleva gafas para observar la herida u observa la herida a través de una lente integrada en la fuente luminosa. Las gafas o la lente tienen un sistema de filtración de luz que excluye las longitudes de onda de luz por debajo del intervalo de emisión de fluorescencia del agente de tinción y permite que cualquier fluorescencia se observe de modo notablemente claro y específico y por tanto, la detección de cualquier biofilm presente.

Típicamente, el tratamiento debería tener lugar en los cambios de vendaje subsiguientes. La herida puede examinarse ulteriormente en cuanto a presencia y reducción del biofilm - a simple vista o con la fuente luminosa y las gafas o la lente integrada. La herida puede vendarse luego con un vendaje primario y secundario apropiado.

Lo que sigue es una breve descripción de las figuras y tablas:

Figura 1. Selección inicial de colorantes seleccionados como tintes de biofilm utilizando biofilms desarrollados en el CDFF (n = 6).

Figura 2a. Selección de colorantes seleccionados como tintes de biofilm utilizando biofilms desarrollados en el reactor de biofilm CDC (n = 9).

Datos de absorción.

Figura 2b. Selección de colorantes seleccionados como tintes de biofilm utilizando biofilms desarrollados en el reactor CDC (n = 9).

Datos de concentración.

Figura 3. Rosa bengala con muestras teñidas (A-C) con EDTA y BaCl (RBEB) y muestras de control (DE) de carne que contenía biofilms mixtos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Figura 4. Edad de un biofilm de *S. aureus* frente a concentración de colorante.

Figura 5. Edad de un biofilm de *P. aeruginosa* frente a concentración de Rosa Bengala.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplo 1

Evaluación de las tinciones de biofilm utilizando el fermentador de biofilm de altura constante

Se utilizó un fermentador de biofilm de altura constante (CDFF) para cultivar biofilms mixtos de 4 días de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Resumidamente, se formaron biofilms en rebajos en 15 cubetas de PTFE alrededor del borde de una mesa rotativa de acero sobre la cual se dejaba gotear continuamente inóculo o medio de crecimiento estéril. Una barra rascadora distribuía el inóculo bacteriano o medio sobre las cubetas a medida que giraba la mesa rotativa, manteniendo los biofilms en una altura constante. Cada cubeta contenía 5 muestras amovibles, de 4 mm de diámetro, que estaban rebajadas hasta una altura de 300 μm . Los biofilms resultantes que crecían en los rebajos de las muestras eran reproducibles en términos de aspecto y composición microbiana, y podían retirarse del CDFF por una abertura de muestreo utilizando instrumentos estériles. Por duplicado, se retiraron del CDFF cubetas que contenían el biofilm, se lavaron una sola vez por inmersión en solución salina estéril durante 5 segundos, y se incubaron luego en volúmenes de 10 mL de los tintes potenciales de biofilm siguientes a concentración 100 μM en agua desionizada a no ser que se indique otra cosa, en la oscuridad durante 2 minutos: Eritrosina; Rosa Bengala; Verde Rápido; Rosa Bengala con 2% peso/volumen de EDTA y 1% peso/volumen de cloruro de benzalconio (BaCl) (RBEB); Rosa Bengala con 2% peso/volumen de EDTA tetrasódico y 1% peso/volumen de cloruro de benzalconio en 2% peso/volumen de hidroxietilcelulosa y 10% peso/volumen de gel de propilenglicol (Gel-RBEB). Después de otro lavado en solución salina, se incubaron durante una noche 6 muestras para cada tinte a 37°C en volúmenes de 6 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% en agua para digestión. Las muestras se centrifugaron luego 13.000 rpm durante 10 min para separar el sobrenadante de los residuos celulares digeridos. Los espectros de absorción de los sobrenadantes aspirados se midieron luego en un espectrofotómetro y estos espectros se compararon con espectros de concentraciones conocidas (100 μM) de cada tinte en SDS al 2%.

La Figura 1 muestra que Verde Rápido parecía ser el tinte más eficaz en los biofilms desarrollados en el CDFF, seguido de cerca por Rosa Bengala con EDTA y BaCl en forma líquida. La adición de los excipientes EDTA y BaCl parecía mejorar la captura de Rosa Bengala en los biofilms.

Ejemplo 2

Evaluación de las tinciones de biofilm utilizando el reactor de biofilm CDC

Se utilizó un reactor de biofilm del Centro para Control de las Enfermedades (CDC) para cultivar biofilms mixtos de 48 horas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Resumidamente, se formaron biofilms sobre probetas en bastoncillos de reactor que se mantuvieron dentro de la vasija del reactor que contenía un cultivo mezclado continuamente de *S. Aureus* y *P. aeruginosa* a 35° C. Las probetas que contenían el biofilm se retiraron de los bastoncillos, se lavaron una sola vez por inmersión en solución salina estéril durante 5 segundos, y se incubaron luego en volúmenes de 10 mL de los tintes de biofilm siguientes a concentración 100 μM en agua desionizada, en la oscuridad durante 2 min: Eritrosina; Rosa Bengala; Azul Alcian; Rodamina B; Rodamina 123; Rosa Bengala con 2% peso/volumen de EDTA y 1%

5 peso/volumen de BaCl (RBEB). Después de otro lavado en solución salina, se añadieron 9 probetas para cada tinción a volúmenes de 2 mL de SDS al 2% para rechazo a ajuste 'alto' durante 1 minuto y se incubaron luego durante una noche en la oscuridad a 37°C, para digestión. Las muestras se centrifugaron luego 13.000 rpm durante 5 min para separar el sobrenadante de los residuos celulares digeridos. Los espectros de absorción de los sobrenadantes aspirados se midieron luego en un espectrofotómetro y estos espectros se compararon con espectros de concentraciones conocidas (100 µM) de cada tinte en SDS al 2%.

10 La figura 2a muestra cómo, en términos de absorción absoluta o 'brillo', RBEB era el tinte de biofilm más eficiente, seguido por el tinte de carbohidrato, Azul Alcian. El EDTA y/o BaCl parecían mejorar la captura de Rosa Bengala más de 60%. Cuando se expresaron los mismos datos como una ratio de absorción medida: absorción a 100 µM (es decir concentración), Azul Alcian parecía ser el tinte de biofilm más eficaz.

Ejemplo 3

15 **Evaluación de tintes de biofilm utilizando un modelo de biofilm de panza de cerdo**

Se utilizó un modelo de biofilm de panza de cerdo para evaluar más los tintes de biofilm. Se cortaron trozos de panza de cerdo utilizando un taladro de 20 mm y una barrena de 6 mm para crear indentaciones en el centro de las muestras. Las muestras se esterilizaron luego por irradiación gamma. Las muestras se inocularon con volúmenes de 10 µl de una suspensión mixta de ~1 x 10⁷ unidades formadoras de colonias/mililitro de *S. aureus* y *P. aeruginosa* y se incubaron luego a 35° C en placas de Petri selladas con Parafilm durante 72-96 horas. Las muestras que parecían tener biofilms visibles únicamente en el orificio central del taladro se tiñeron luego por inmersión de las muestras en volúmenes de 10 mL de Rosa Bengala 100 µM con 2% peso/volumen de EDTA y 1% peso/volumen de BaCl (RBEB) durante 2 minutos con lavado en solución salina antes y después de la tinción. Las muestras de control no se tiñeron y por tanto se sumergieron únicamente en solución salina durante 2 minutos. Las muestras se fotografiaron luego, ejemplos de las cuales se representan en Fig. 3. Las tres muestras (A a C) mostraban que estaban teñidas con RBEB, demostrando claramente la captura selectiva del tinte por los biofilms que estaban contenidos dentro de las indentaciones. Las tres muestras de control demuestran que sin esta tinción es difícil averiguar si y dónde está presente biofilm en las muestras

30 **Ejemplo 4**

Tinción con Rosa Bengala de biofilms desarrollados utilizando un modelo de biofilm en filtro de membrana

35 Se utilizó un modelo de biofilm en filtro de membrana para estudiar el efecto de la concentración de Rosa Bengala sobre la eficacia de la tinción del biofilm. Resumidamente, se añadió un volumen de 5 µL de una suspensión de 5 x 10⁵ unidades formadoras de colonias/mililitro de *S. aureus* o *P. aeruginosa* al centro de discos de filtros de membrana estériles (tamaño de poro 0,2 µm; Anodisc, Whatman) que se pusieron en volúmenes de 7 mL de Caldo Tríplico de Soja estéril en placas de 6 pocillos tapadas. Las muestras se incubaron durante 4 horas (biofilms inmaduros), y 24 y 48 horas (biofilms maduros), y el exceso de células planctónicas se retiró de los filtros por lavado. Los biofilms que se encontraban en los filtros se tiñeron por pipeteado de volúmenes de 2 mL de Rosa Bengala (60 µM o 300 µM) o solución salina (control negativo) durante 30 segundos, seguido por lavado. El Rosa Bengala se recuperó de las muestras de biofilm por rechazo y digestión durante una noche en dodecilsulfato de sodio al 2%, centrifugación, y medición posterior de los espectros de absorción en un espectrofotómetro UV-vis. La captura de Rosa Bengala por muestra se determinó por comparación de los valores de absorción con una curva estándar de Rosa Bengala en SDS al 2%.

45 Las Tablas 1 y 2 muestran que los biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa* capturaban Rosa Bengala de una manera dependiente de la concentración de colorante y la edad del biofilm. Únicamente a las concentraciones máximas de 300 µM parecían teñirse los biofilms inmaduros de 4 horas, aunque esto se debía probablemente a cierta tinción de los filtros propiamente dichos. Las Figuras 4 y 5 muestran cómo los biofilms maduros de 48 horas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* capturaban más Rosa Bengala que los biofilms de 24 horas, y también que Rosa Bengala 300 µM daba como resultado una tinción significativamente mayor de los biofilms que Rosa Bengala 60 µM. Este método simple para cuantificar la captura de Rosa Bengala por los biofilms utiliza los espectros de absorción del colorante. La utilización de los espectros de absorción para cuantificar el colorante es similar a la detección de la fluorescencia utilizando una fuente luminosa con filtros ópticos. La captura podría observarse alternativamente de modo cualitativo a simple vista o por observación de la emisión de fluorescencia del Rosa Bengala en conjunción con una fuente luminosa y un filtro óptico.

60

Tabla 1

Edad (h)	[RB] (µM)	1	2	3	Media	S.D.
4	0	0	0	0	0	0
4	60	0	0	0	0	0

ES 2 609 612 T3

4	300	z,59	1,45	1,64	1,56	0,10
24	0	0	0	0	0	0
24	60	1,66	1,72	2,17	1,85	0,28
24	300	4,82	4,55	3,95	4,44	0,45
48	0	0	0	0	0	0
48	60	1,22	1,12	1,37	1,24	0,12
48	300	6,26	5,18	5,71	5,72	0,54

Tabla 2

Edad (h)	[RB] (uM)	1	2	3	Media	S.D.
4	0	0	0	0	0	0
4	60	0	0	0	0	0
4	300	1,52	1,76	1,88	1,72	0,18
24	0	0	0	0	0	0
24	60	2,04	1,76	2,02	1,94	0,15
24	300	5,05	5,84	4,41	5,10	0,72
48	0	0	0	0	0	0
48	60	3,15	1,66	2,37	2,39	0,74
48	300	6,20	9,01	6,69	7,30	1,50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de tinte para uso en la producción de biofilm detectable en tejido viable, en donde la composición tiñe preferentemente el biofilm en lugar del tejido viable y comprende 0,1 a 2,0% en peso de EDTA, 0,1 a 1,0% en peso de un surfactante, y 0,0001% a 1% en peso, preferentemente 0,0025% a 0,025% en peso de un agente de tinción para teñir dicho biofilm y hacerlo detectable, **caracterizada por que** la composición es un líquido, el agente de tinción es Rosa Bengala y el surfactante se selecciona de cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.
- 10 2. Una composición para uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la composición tiñe preferentemente el biofilm por fijación selectiva al biofilm, siendo la composición opcionalmente capaz de teñir preferentemente los biofilms por fluorescencia y detección visual a simple vista o utilizando una fuente luminosa y filtros ópticos correspondientes a los espectros de emisión de fluorescencia del agente de tinción.
- 15 3. Una composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada por que** la composición permite la detección del biofilm por tinción y revelado preferentes del mismo, preferiblemente a simple vista.
- 20 4. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada por que** el agente de tinción absorbe luz de longitudes de onda que van desde 380 nm a 720 nm.
- 25 5. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la composición permite la detección del biofilm por tinción y revelado preferentes del mismo cuando se ilumina éste con luz que incluye longitudes de onda que causan que el mismo emita fluorescencia.
- 30 6. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la composición es una solución líquida basada en agua o glicerol (en forma de un aplicador, nebulizador u hoja).
- 35 7. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la composición comprende además al menos un agente adicional seleccionado del grupo constituido por un humectante y un agente de rotura de biofilms.
- 40 8. Un kit de partes para uso en la detección de biofilms en tejido viable, comprendiendo el kit: una composición según la reivindicación 1 y una fuente luminosa capaz de causar que el agente de tinción del biofilm emita fluorescencia.
- 45 9. Un kit para uso según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la fuente luminosa emite luz para hacer que el agente de tinción emita fluorescencia.
- 50 10. Un kit para uso según las reivindicaciones 8 ó 9, **caracterizado por que** el mismo comprende gafas o lentes para uso en la detección del biofilm, en donde las gafas o lente actúan para excluir todas las longitudes de onda de luz excepto aquéllas a las cuales el agente de tinción emite fluorescencia.
11. Un kit para uso según las reivindicaciones 8, 9 ó 10 que comprende adicionalmente una solución de irrigación de herida.
12. Uso de una composición según la reivindicación 1 para detección de un biofilm en una herida, que comprende los pasos de:
(a) aplicar dicha composición;
(b) examinar el tejido respecto a la presencia de biofilm teñido a simple vista o con una fuente luminosa que causa que el biofilm teñido emita fluorescencia;
(c) detectar la fluorescencia emitida por el biofilm teñido.

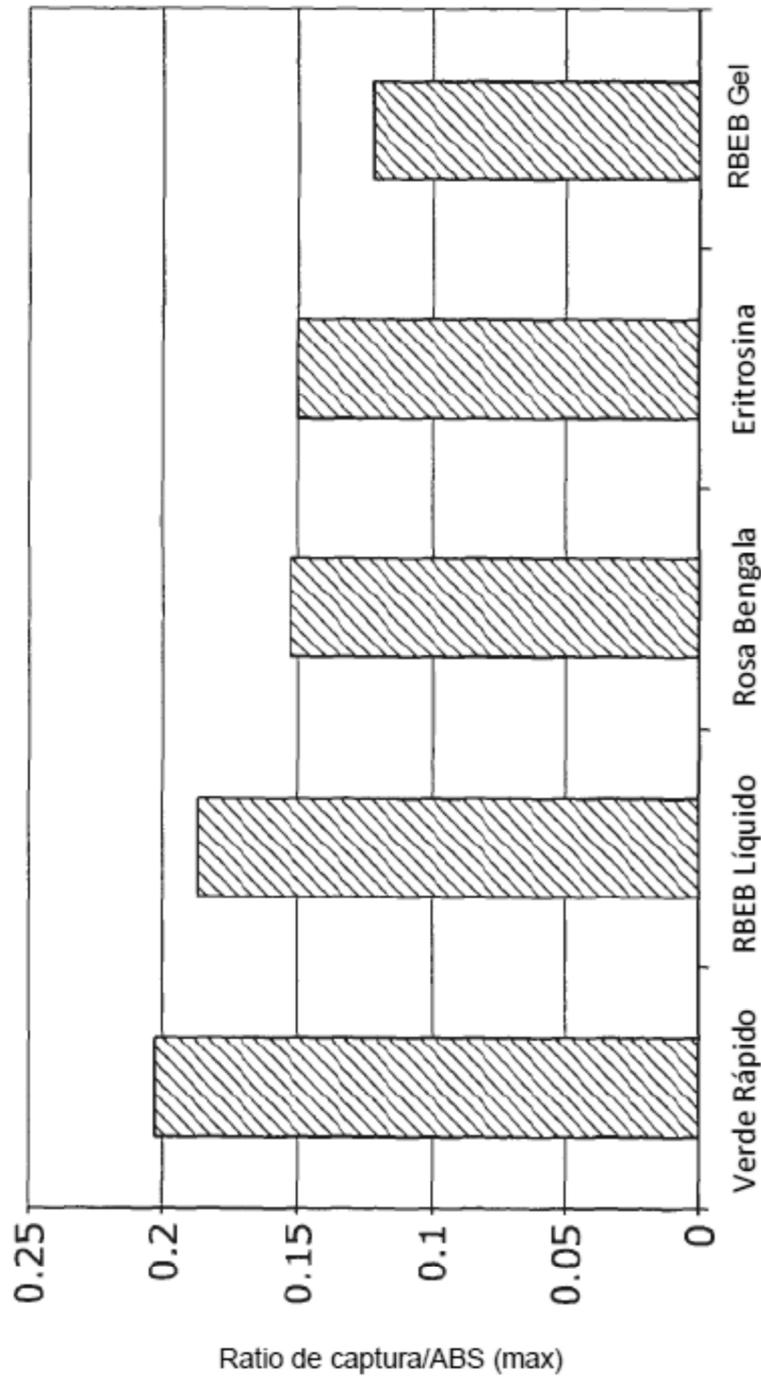


Figura 1

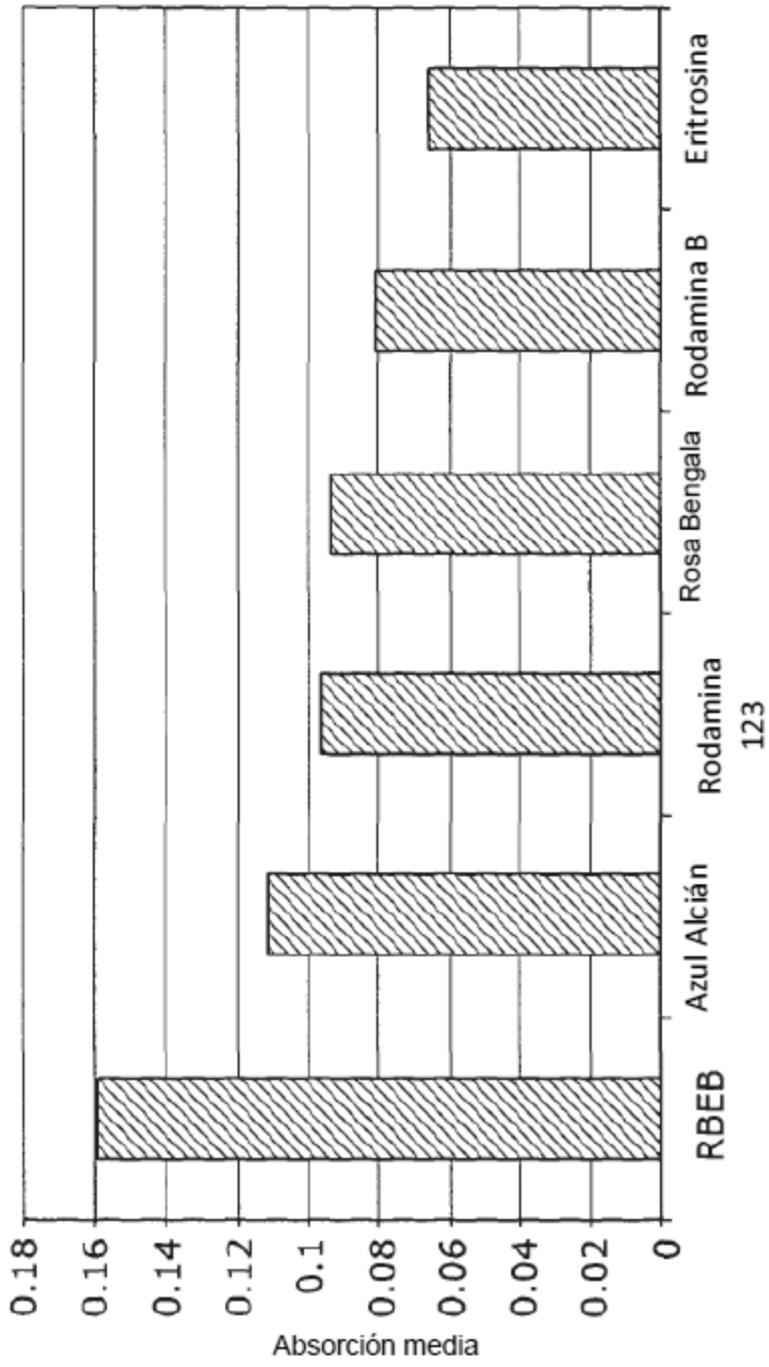


Figura 2a

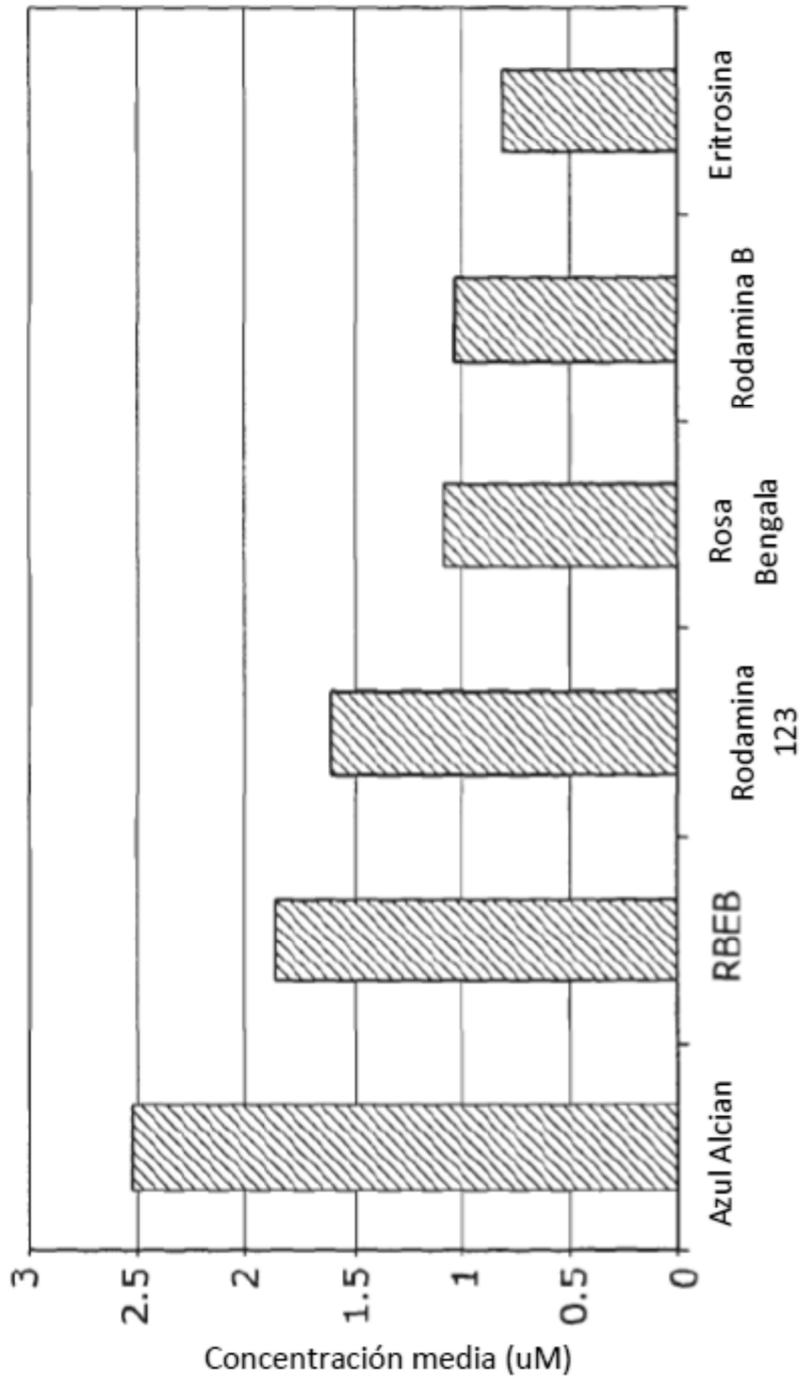


Figura 2b

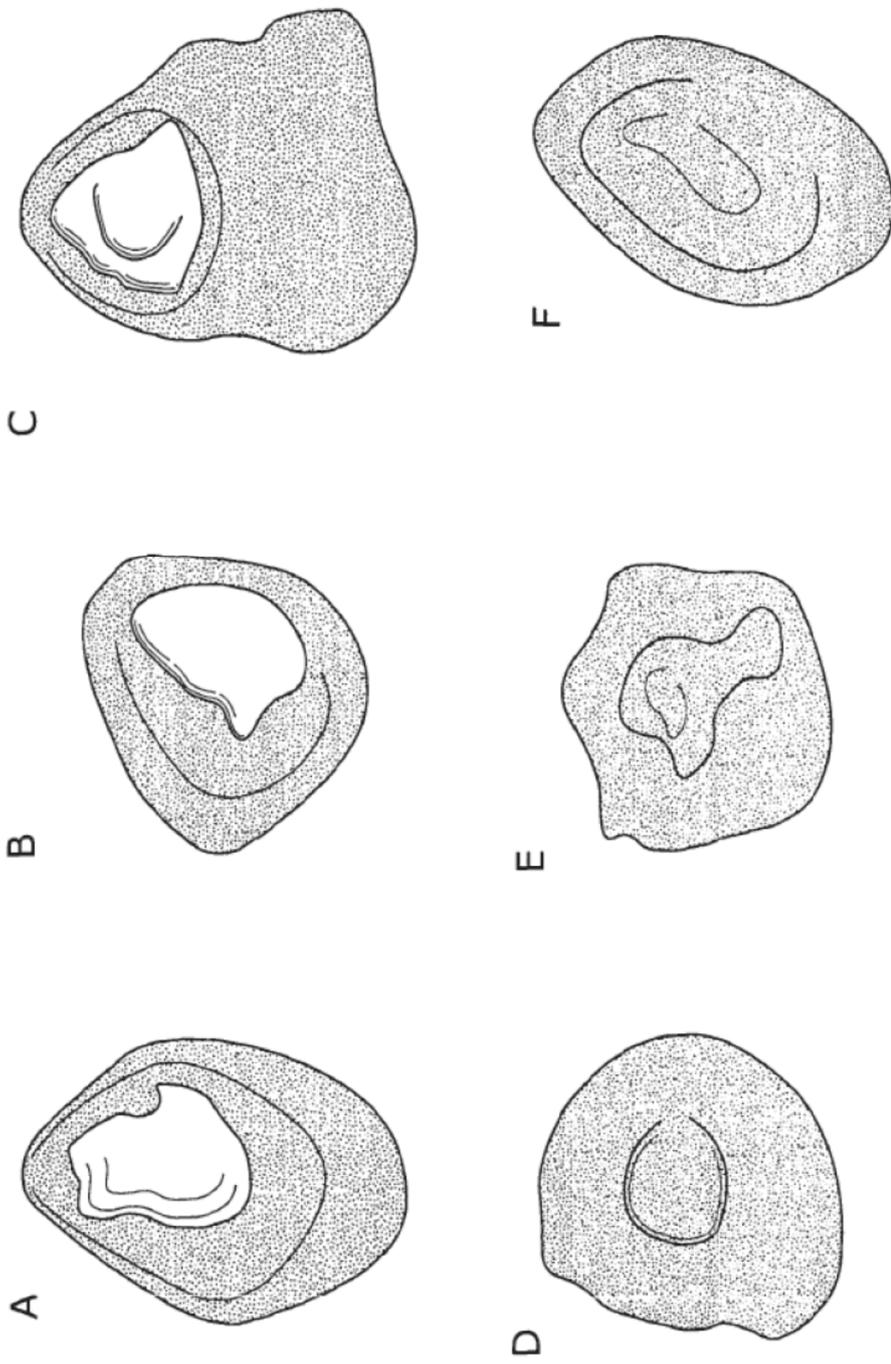


Figura 3

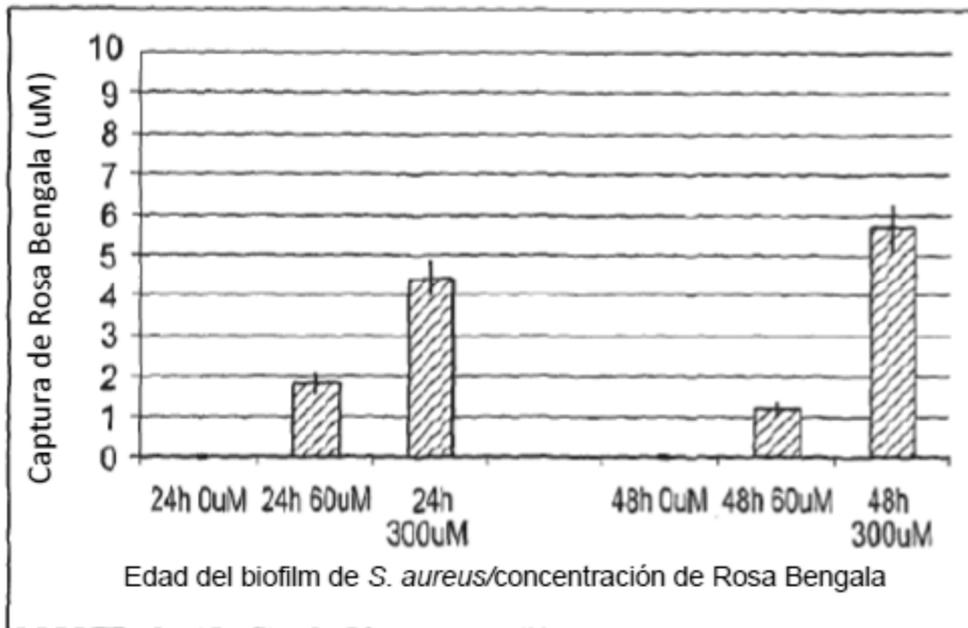


Figura 4

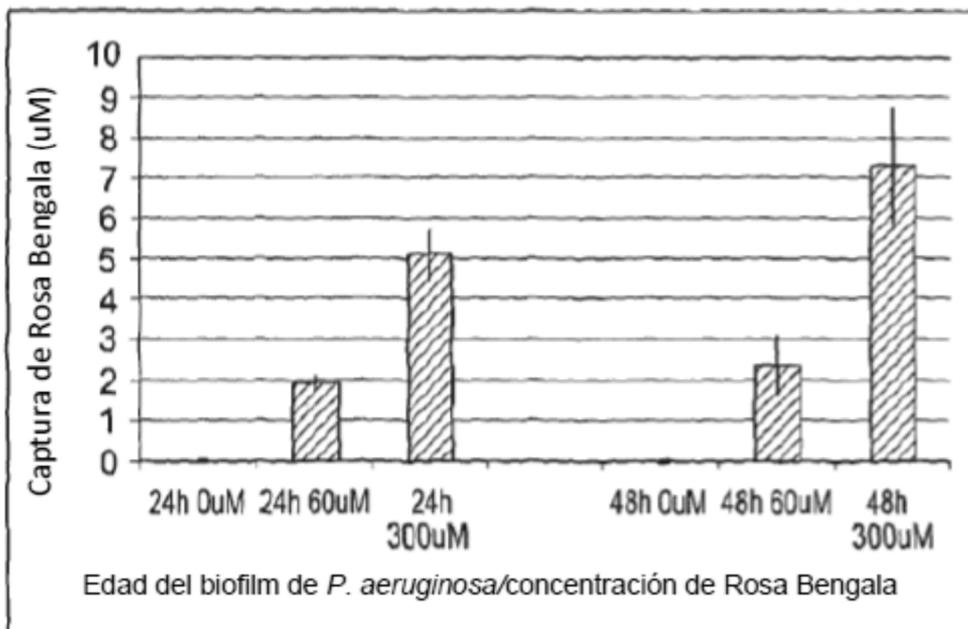


Figura 5