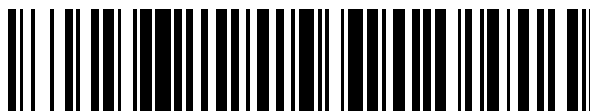


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 971**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2014 PCT/EP2014/060943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2014 E 14727196 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3004895**

54 Título: **Métodos y sistemas de uso en diagnósticos neonatales**

30 Prioridad:

27.05.2013 DK 201370284

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

07.11.2019

73 Titular/es:

**SIME DIAGNOSTICS LTD. (100.0%)
43 Manchester Street
London W1U 7LP, GB**

72 Inventor/es:

**VERDER, HENRIK y
HÖSKULDSSON, AGNAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 729 971 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

Métodos y sistemas de uso en diagnósticos neonatales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de las pruebas diagnósticas y el diagnóstico neonatal y al tratamiento de trastornos del recién nacido. Por lo tanto, la invención se refiere al campo de los procedimientos y herramientas para diagnosticar el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) del recién nacido, en particular en los recién nacidos prematuros.

Antecedentes

La deficiencia de tensioactivo al nacer y el desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido (SDR) es la causa más importante de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos prematuros.

Síndrome de dificultad respiratoria

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR), también llamado síndrome de dificultad respiratoria idiopática (IRDS, por sus siglas en inglés) o síndrome de dificultad respiratoria neonatal [1], y enfermedad de membrana hialina (HMD, por sus siglas en inglés), es un síndrome en bebés prematuros causado por una insuficiencia del desarrollo de la producción de tensioactivo y una inmadurez estructural de los pulmones. También puede ser el resultado de un problema genético con la producción de proteínas asociadas al tensioactivo. El SDR afecta aproximadamente al 1 % de los recién nacidos y es la principal causa de muerte y morbilidad en los recién nacidos prematuros [2]. La incidencia disminuye con el avance de la edad gestacional, desde aproximadamente el 50 % en bebés nacidos a las 26-28 semanas, hasta aproximadamente el 25 % a las 30-31 semanas. El síndrome es más frecuente en bebés de madres diabéticas, en el segundo nacimiento de gemelos prematuros y en partos inducidos o cesáreas.

La aparición del SDR es poco después del nacimiento, y se manifiesta por taquipnea, taquicardia, retracciones de la pared torácica (recesión), quejido espiratorio, aleteo nasal y cianosis durante los esfuerzos de respiración. A medida que avanza la enfermedad, el recién nacido puede desarrollar una insuficiencia respiratoria (aumento de las concentraciones de dióxido de carbono en la sangre) y cese prolongado de la respiración ("apnea"). Ya sea tratada o no, el curso clínico para la enfermedad aguda dura aproximadamente de 2 a 5 días. Durante los primeros días, el cuadro clínico del paciente empeora y requiere más asistencia. A pesar de los grandes avances en la atención, el SDR sigue siendo la causa más común de muerte en el primer mes de vida. Las complicaciones incluyen trastornos metabólicos (acidosis, hipoglucemia), ductus arterioso persistente, presión arterial baja, cambios crónicos en los pulmones y hemorragia intracraneal. La enfermedad con frecuencia se complica por la prematuridad y sus defectos adicionales en la función de otros órganos.

La histopatología característica observada en bebés que mueren por SDR fue el origen del nombre "enfermedad de membrana hialina". Las capas de membrana hialina de aspecto ceroso recubren los alvéolos colapsados del pulmón. Además, los pulmones muestran sangrado, sobredistensión de las vías respiratorias y daño a las células de revestimiento.

Los casos de moderados a graves de SDR progresarán si la afección no se trata. La presión positiva continua nasal temprana en las vías respiratorias (nCPAP) disminuye o detiene la progresión, por lo que en muchos casos se puede evitar la ventilación mecánica (VM) [3-5].

Además, aproximadamente la mitad de los bebés con SDR tratados con nCPAP necesitan suplementos de tensioactivo para detener la progresión [6, 7], ya que los pulmones de los niños con SDR tienen un desarrollo deficiente de tensioactivo. Del mismo modo, aproximadamente el 50 % de los niños tratados con VM necesitan tensioactivo [8]. Estos bebés, en contraste con los bebés tratados con nCPAP, a menudo requieren más dosis de tensioactivo para una respuesta constante [6].

55 *Tensioactivo*

El tensioactivo es un complejo de lipoproteínas tensioactivo producido por células pulmonares especializadas llamadas células de tipo II o neumocitos de tipo II. Las proteínas y los lípidos que comprenden el tensioactivo tienen una región hidrófila y una región hidrófoba. Al adsorber la interfaz aire-agua de los alvéolos con los grupos de cabeza hidrófilos en el agua y las colas hidrófobas hacia el aire, el componente lipídico principal del tensioactivo, la

dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), reduce la tensión superficial. Además de la DPPC, que constituye aproximadamente el 40 %, el complejo de tensioactivo comprende aproximadamente un 40 % de otros fosfolípidos, aproximadamente un 5 % de proteínas asociadas a tensioactivo (SP-A, B, C y D) y, además, colesterol y cantidades mínimas de otras sustancias.

5

La función del complejo de tensioactivo es aumentar la distensibilidad pulmonar, prevenir la atelectasia (colapso del pulmón) al final de la espiración y facilitar el reclutamiento de las vías respiratorias colapsadas.

El tensioactivo ayuda a prevenir el colapso de los espacios aéreos terminales a lo largo del ciclo normal de inhalación y exhalación. El agente tensioactivo es empaquetado por la célula en estructuras llamadas cuerpos lamelares y expulsado en los espacios aéreos. Los cuerpos lamelares se despliegan posteriormente en un complejo revestimiento del espacio aéreo. Esta capa reduce la tensión superficial del fluido que recubre el espacio aéreo. La tensión superficial es responsable de aproximadamente 2/3 de las fuerzas de retroceso elásticas. De la misma manera que una burbuja se contraerá para dar el área de superficie más pequeña para un volumen dado, la interfaz aire/agua significa que la superficie del líquido tenderá a ser lo más pequeña posible, lo que provocará que el espacio de aire se contraiga. Al reducir la tensión superficial, el tensioactivo evita que los espacios de aire se colapsen completamente en la exhalación. Además, la tensión superficial reducida permite volver a abrir el espacio de aire con una menor fuerza. Por lo tanto, sin cantidades adecuadas de tensioactivo, los espacios aéreos se colapsan y son muy difíciles de expandir. Microscópicamente, un pulmón con poco tensioactivo se caracteriza por espacios aéreos colapsados que se alternan con áreas hiperexpandidas, congestión vascular y, con el tiempo, membranas hialinas. Las membranas hialinas están compuestas de fibrina, residuos celulares, glóbulos rojos, neutrófilos poco frecuentes y macrófagos. Aparecen como un material amorfo eosinófilo, que recubre o llena los espacios de aire y bloquea el intercambio de gases. Como resultado, la sangre que pasa a través de los pulmones no puede recoger oxígeno y descargar dióxido de carbono. Los niveles de oxígeno en la sangre disminuyen y el dióxido de carbono aumenta, lo que provoca un aumento de los niveles de ácido en la sangre y la hipoxia. La inmadurez estructural, como se manifiesta por la disminución del número de unidades de intercambio gaseoso y paredes más gruesas, también contribuye al proceso de la enfermedad. El oxígeno terapéutico y la ventilación con presión positiva, aunque pueden salvar vidas, también pueden dañar el pulmón. El diagnóstico actual se basa en el cuadro clínico complementado con una radiografía de tórax, que muestra volúmenes reducidos de los pulmones (tórax con forma de campana), un infiltrado pequeño (0,5-1 mm), discreto y uniforme (a veces descrito como una apariencia de "vidrio esmerilado"), que afecta a todos los lóbulos del pulmón, y broncogramas de aire (es decir, el infiltrado resaltará los conductos de las vías aéreas más grandes que permanezcan llenos de aire). En casos graves, esto se vuelve exagerado hasta que los bordes cardíacos se vuelven inaparentes (una apariencia de "desaparición").

En embarazos de más de 30 semanas, la madurez pulmonar fetal se puede probar tomando una muestra de la cantidad de tensioactivo en el líquido amniótico mediante amniocentesis, donde se inserta una aguja de jeringa de muestreo a través del abdomen y el útero de la madre. Actualmente hay varias pruebas disponibles que correlacionan la producción de tensioactivo. Una de las pruebas más importantes implica la medición de la relación de concentración entre la lecitina de fosfolípidos y la esfingomielina, la llamada "relación L/S". Si la relación L/S es inferior a aproximadamente 2,0, esto es una indicación de que los pulmones fetales son deficientes [9]. Un procedimiento terapéutico habitual en lactantes muy prematuros ha sido comenzar con nCPAP y, como el tensioactivo se administra mejor antes que tarde [6,10,11], se debe administrar tensioactivo durante una breve intubación tan pronto como los síntomas clínicos y una demanda de oxígeno en aumento indiquen SDR de moderado a grave [6,12]. Este procedimiento denominado INSURE (extubación con tensioactivo de intubación) ahora se usa ampliamente y esto ha provocado un menor uso de VM [10] y una menor incidencia de displasia broncopulmonar (DBP) [11,13]. Muchos bebés aún reciben tensioactivo relativamente tarde, por lo general, la edad media en el tratamiento fue de 5 h [4]. Además, faltan los criterios clínicos comunes para la identificación de niños con SDR que necesitan tensioactivo y el momento de este tratamiento [14]. En consecuencia, existe la necesidad de un procedimiento cuantitativo rápido para identificar cuál de los recién nacidos muy prematuros tiene un alto riesgo de nCPAP fallida y, por lo tanto, debería recibir tensioactivo en una etapa temprana. El tratamiento con tensioactivo profiláctico como alternativa ha demostrado ser insuficiente [13]. Preferentemente, el diagnóstico y el tratamiento deben comenzar inmediatamente después del nacimiento. Los procedimientos del estado actual de la técnica requieren que se realicen pruebas de laboratorio que requieren mucho tiempo, lo que retrasa el diagnóstico y el inicio de la medicación de quienes los necesitan [15]. Además, el procedimiento de [15] se basa en el análisis del líquido amniótico. Si bien puede obtenerse líquido amniótico sin contaminantes en relación con el parto por cesárea, es difícil obtener líquido amniótico sin contaminantes después del parto vaginal, lo que compromete la precisión diagnóstica. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos analíticos rápidos para diagnosticar SDR después del nacimiento.

Peneff et al. (Determination of lecithin and sphingomyelin (L/S ratio) in gastric and/or pharyngeal aspirates of the

newborn; *Minerva Pediatrica*, vol. 31, no. 11, 1979, 835-840) revela la determinación de la relación L/S en una muestra de pequeño volumen de aspirado gástrico por cromatografía como indicador de SDR con un tiempo hasta el resultado de más de 10 minutos.

5 Liu et al. (Rapid determination of fetal lung maturity from infrared spectra of amniotic fluid; *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 178, no. 2, 1998, 234-241) resume los procedimientos conocidos para predecir el SDR. Estos procedimientos implican determinar la relación L/S a partir de una muestra de líquido amniótico.

Liu et al. (Comparison of infrared spectroscopic and fluorescence depolarisation assays for fetal lung maturity; *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 183, no.1, 2000, 181-187) describe el uso de la espectroscopia infrarroja para determinar la relación L/S a partir de una muestra de líquido amniótico.

Hosafci et al. (Clinical chemistry without reagents? An infrared spectroscopic technique for determination of clinically relevant constituents of body fluids; *Anal Bioanal Chem* 2007, 387:1815-1822) describe un procedimiento para
 15 analizar sangre entera, plasma y orina. Dreissig et al. (Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression; *Spectrochimica Acta Part A* 71 (2009) 2069-2075) revela que los niveles de esfingomielina en el cerebro se pueden medir mediante espectroscopia IR. Kuligowski et al. (Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier transform infrared spectroscopy; *Talanta* 77 (2008) 229-234) describe un procedimiento para analizar altos contenidos de lecitina en suplementos dietéticos utilizando
 20 espectroscopia FTIR.

Resumen

Los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para determinar la proporción entre lecitina y
 25 esfingomielina obtenida del recién nacido, sin preparaciones de laboratorio de la muestra que requieren mucho tiempo. La proporción resultante permite al médico determinar si el bebé padece SDR. La velocidad y la precisión del procedimiento de diagnóstico aseguran que la medicación adecuada pueda comenzar sin retraso, lo que es un factor decisivo para el tratamiento con éxito del SDR. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto, el procedimiento comprende
 30 los pasos de:

- a) proporcionar menos de 30 µl de una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto,
- b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- 35 c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

El presente procedimiento puede implementarse al menos parcialmente en un ordenador. Por lo tanto, una
 40 realización adicional de la divulgación se relaciona con un procedimiento implementado por ordenador para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto según datos espectrales adquiridos a partir de una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, donde el procedimiento comprende los pasos de:

- a) determinar la actividad y/o concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra
 45 mediante el análisis de dichos datos espectrales, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- c) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos,
- d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

50 Por lo tanto, el presente procedimiento puede integrarse en un ordenador personal o puede efectuarse desde un sitio web, teléfono móvil, teléfono inteligente u otro dispositivo electrónico capaz de ejecutar un código de ordenador. Una realización adicional de la divulgación, por lo tanto, se refiere a un producto de programa informático que tiene un medio legible por ordenador, donde dicho producto de programa informático es adecuado para diagnosticar una
 55 enfermedad respiratoria de un sujeto basándose en datos espectrales adquiridos a partir de una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, donde dicho producto de programa informático comprende medios para llevar a cabo todos los pasos del procedimiento aquí descrito.

Como el tiempo puede ser un problema en el diagnóstico de la presente divulgación, el diagnóstico puede integrarse
 60 ventajosamente en un sistema de diagnóstico que puede instalarse en servicios hospitalarios, tales como el servicio

de neonatología, preferentemente en la sala de parto. Dicho sistema puede integrar la espectroscopia, el análisis y la indicación de la enfermedad que puede proporcionar una indicación de la enfermedad en unos minutos después de que se haya obtenido una muestra biológica. Una realización adicional de la divulgación, por lo tanto, se refiere a un sistema para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto según una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, que comprende

- un espectroscopio para medir datos espectrales de dicha muestra,

- medios de procesamiento configurados para

10

a) determinar la actividad y/o concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra mediante el análisis de dichos datos espectrales, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,

b) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos,

15 c) correlacionar dicha relación con una relación de control, y

d) indicar si la proporción es distinta a la proporción de control, donde una diferencia predefinida es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

El sistema puede ser parte de un sistema de monitorización sanitaria como se describe en el documento WO 2008/019695, que describe un servicio de monitorización sanitaria basado en un servidor central, donde la medición de las muestras biológicas se realiza como una medición local y los datos de medición son posteriormente enviados a un servidor central, donde los datos se procesan y analizan, por ejemplo, mediante sistemas de conocimiento experto, y se genera un perfil sanitario que se envía de vuelta al sistema local. Por lo tanto, los medios de procesamiento pueden estar integrados total o parcialmente en un servicio central a distancia del servicio del hospital local o incluso a distancia del hospital. Sin embargo, los medios de procesamiento también pueden estar completamente integrados en el sistema local, de modo que el sistema ubicado en el departamento del hospital incluya espectrómetro, análisis espectral y procesamiento e indicación de la enfermedad.

En base a los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente en este documento, se puede lograr un tratamiento rápido del individuo que lo necesite, lo que resulta en una mejor tasa de supervivencia del individuo. La divulgación es particularmente adecuada para diagnosticar y tratar a un recién nacido, como un bebé prematuro.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de SDR en un individuo recién nacido, donde el procedimiento comprende las etapas de:

35

a) proporcionar menos de 30 μL de una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,

b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,

c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),

40 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

e) si la proporción de d) es inferior a $2,0 \pm 0,5$, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tensioactivo al individuo recién nacido.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de SDR en un individuo recién nacido, donde el procedimiento comprende las etapas de:

a) proporcionar menos de 100 μL , como menos de 95 μL , como menos de 90 μL , como menos de 85 μL , como menos de 80 μL , como menos de 75 μL , como menos de 70 μL , como menos de 65 μL , como menos de 60 μL , como menos de 55 μL , como menos de 50 μL , como menos de 45 μL , como menos de 40 μL , como menos de 35 μL , como menos de 30 μL , como menos de 25 μL , como menos de 20 μL , como menos de 19 μL , como menos de 18 μL como menos de 17 μL , como menos de 16 μL , como menos de 15 μL , como menos de 14 μL , como menos de 13 μL , como menos de 12 μL , como menos de 11 μL , como menos de 10 μL , como menos de 9 μL , como menos de 8 μL , como menos de 7 μL , como menos de 6 μL , como menos de 5 μL , como menos de 4 μL , como menos de 3 μL , como menos de 2 μL , como menos de 1 μL , como menos de 0.9 μL , como menos de 0,8 μL , como menos de 0,7 μL , como menos de 0,6 μL , como menos de 0,5 μL , como menos de 0,4 μL , como menos de 0,3 μL , como menos de 0,2 μL , como menos de 0,1 μL de una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,

50 b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,

60

- c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
 e) si la relación de d) es menor que $2,0 \pm 0,5$, tal como $2,0 \pm 0,4$, tal como $2,0 \pm 0,3$, tal como $2,0 \pm 0,2$, tal como $2,0 \pm 0,1$, tal como $2,0 \pm 0,05$, al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tensioactivo para el recién nacido.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de SDR en un individuo recién nacido, donde el procedimiento comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,
 b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
 c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
 15 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
 e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del tensioactivo al individuo recién nacido, si la proporción determinada en el paso d) es menor que $2,0 \pm 0,5$.
- 20 En un aspecto, la descripción se refiere al uso de tensioactivo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de SDR en un individuo recién nacido que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,
 b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un
 25 segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
 c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
 e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del tensioactivo al individuo recién nacido, si la proporción
 30 determinada en el paso d) es menor que $2,0 \pm 0,5$.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Descripción del procedimiento

- 35 El paso 1) incluye proporcionar una muestra de aspirado gástrico.
 El paso 2) comprende aplicar la muestra al instrumento; colocar un haz de luz infrarrojo (IR) de múltiples frecuencias a través de la muestra; medir la absorbancia de luz molecular/ luminiscencia en los espectros de frecuencia de luz infrarroja; pasar los datos del espectro de absorbancia sin procesar pasados a la unidad de procesamiento. El paso 3) comprende el procesamiento de datos sin procesar mediante el algoritmo de Transformada de Fourier (FT) para
 40 producir la longitud de onda de absorción de la luz.
 El paso 4) comprende extraer información química (concentración y/o actividad de lecitina y esfingomielina) de las firmas espectrales a través del algoritmo de quimiometría (análisis de datos multivariados).
 El paso 5) comprende obtener una relación L/S y, opcionalmente, un régimen de tratamiento recomendado.

45 Figura 2: Comparación del tiempo con el tratamiento con tensioactivo del procedimiento de la presente divulgación, frente al tiempo con el tratamiento con tensioactivo de las técnicas más modernas. La morbilidad y los requisitos de oxigenación aumentan significativamente con el tiempo, y en consecuencia, un diagnóstico rápido de SDR es esencial para minimizar la morbilidad de los recién nacidos que sufren SDR.

50 Figura 3: En la figura de la izquierda se muestran los resultados de la calibración. El valor R^2 entre los valores de la relación LS medidos y los calculados es de 0,99. La figura de la derecha muestra los resultados de la validación cruzada. El valor R^2 entre los valores de la relación LS medidos y los validados cruzados es de 0,96.

Descripción detallada

- 55 La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

Definiciones

60

Medios de análisis: El término "medios de análisis", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un instrumento capaz de detectar la propiedad física de una molécula o grupo de moléculas. En una realización de la divulgación, los medios de análisis son un espectrómetro FTIR. Preferentemente, los medios de análisis son un espectrómetro Bruker alpha FTIR capaz de realizar mediciones en volúmenes de muestra muy pequeños, como por ejemplo hasta 1 µL.

IR medio: El término IR medio o infrarrojo de longitud de onda media, también llamado infrarrojo intermedio (IIR) y espectroscopia FTIR rojo-medio, como se utiliza aquí, se refiere a la luz que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 50 µm.

Recién nacido prematuro: El término recién nacido prematuro, como se utiliza en este documento, se refiere a un bebé nacido antes de o hasta 37 semanas de embarazo.

Síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido: El término "síndrome de dificultad respiratoria", como se utiliza en el presente documento, se refiere al término tal como lo entienden los expertos en la técnica. El SDR también se puede definir como P22.0 de la clasificación de enfermedades de la CIE-10 de la OMS. La abreviatura SDR significa síndrome de dificultad respiratoria.

Método diagnóstico

Es esencial para el éxito del tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en recién nacidos prematuros, evaluar rápidamente el estado del desarrollo de los pulmones del lactante. Esto se puede realizar midiendo la cantidad de lecitina y esfingomielina. Sin embargo, los procedimientos conocidos hasta la fecha requieren una preparación de la muestra que requiere mucho tiempo y, por lo tanto, retrasa el inicio de la medicación con tensioactivo. Los procedimientos del estado actual de la técnica además se basan en un líquido amniótico que puede ser difícil de obtener en forma pura durante el parto vaginal normal.

Los presentes inventores han encontrado que una alternativa al fluido amniótico es obtener y medir la cantidad de lecitina y esfingomielina en el aspirado gástrico obtenido del recién nacido. Sin embargo, de los recién nacidos prematuros solo se pueden obtener volúmenes muy pequeños de aspirado gástrico. Por lo tanto, los procedimientos convencionales conocidos en la técnica no pueden aplicarse fácilmente a muestras obtenidas de aspirado gástrico.

Los presentes inventores han abordado estos dos problemas y encontraron que es posible analizar muestras de muy bajo volumen de aspirado gástrico obtenido del individuo recién nacido y determinar la proporción entre lecitina y esfingomielina en la muestra, sin preparaciones de laboratorio de la muestra que requieran mucho tiempo.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto, el procedimiento comprende los pasos de:

- 40 a) proporcionar menos de 30 µl de una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto,
- b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- 45 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para diagnosticar SDR de un sujeto, donde el procedimiento comprende las etapas de:

- 50 a) proporcionar menos de 30 µl de una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto,
- b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- 55 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

El procedimiento de la presente divulgación se puede utilizar para diagnosticar cualquier trastorno asociado con un biomarcador medible por los medios de análisis de la presente divulgación. En una realización de la divulgación, el trastorno respiratorio diagnosticado por el procedimiento de la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en síndrome de dificultad respiratoria, taquipnea transitoria del recién nacido (TTN).

En un entorno clínico, el médico que utiliza la presente divulgación puede, basándose en el resultado del procedimiento de diagnóstico según la presente divulgación, aplicar el procedimiento de exclusión, para determinar si el sujeto del cual se obtuvo la muestra, padece SDR. Si el resultado del procedimiento indica una relación L/S 5 significativamente superior a 2,0, el sujeto no sufre SDR. Si el médico determina que la condición del sujeto es grave, pero que la relación L/S está significativamente por encima de $2,0 \pm 0,5$, el médico puede concluir que el sujeto padece una condición crítica distinta a SDR, y continuar analizando y aplicando el tratamiento adecuado.

De este modo, en una realización de la divulgación, el biomarcador analizado por los medios de análisis de la 10 divulgación se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas.

En una realización de la divulgación, el primer grupo de compuestos se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas.

15 En una realización de la divulgación, el segundo grupo de compuestos se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas.

En una realización de la divulgación, el segundo grupo de compuestos comprende albúmina, por ejemplo, albúmina 20 de suero humano.

En una realización de la divulgación, el primer y el segundo compuesto son ambos fosfolípidos, tales como dos fosfolípidos distintos. El primer compuesto es normalmente lecitina y el segundo compuesto es normalmente esfingomielina.

25 Aunque la presente divulgación tiene como objetivo determinar la relación entre un primer y un segundo compuesto, tal como lecitina y esfingomielina respectivamente, otros compuestos o grupos de compuestos pueden cuantificarse con fines analíticos o para compensar el ruido espectral de fondo. Así, en una realización, la divulgación también se refiere a la determinación de la cantidad de un tercer, cuarto, quinto o compuesto adicional, tal como un compuesto 30 seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilglicerol, hemoglobina, apohemoglobina, hem y porfirina. En particular, el tercer compuesto es la hemoglobina.

En una realización, la divulgación se refiere al procedimiento definido anteriormente y a una etapa adicional que comprende restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad del primer compuesto, por lo que se obtiene así una 35 cantidad corregida de fondo del primer compuesto.

De manera similar, en una realización, la divulgación se refiere al procedimiento definido anteriormente y a una etapa adicional que comprende restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad del segundo compuesto, por lo 40 que se obtiene así una cantidad corregida de fondo del segundo compuesto.

En otra realización, la divulgación se refiere al procedimiento definido anteriormente y a una etapa adicional que comprende restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad tanto del primer como del segundo compuesto, por lo que se obtiene así una cantidad corregida de fondo tanto del primer como del segundo compuesto.

45 La cantidad del compuesto o grupo de compuestos se puede determinar midiendo la actividad y/o la concentración del compuesto o grupo de compuestos.

El procedimiento de la presente divulgación se puede aplicar a cualquier mamífero, sin embargo, en una realización de la divulgación, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un bebé, tal como un recién nacido.

50 El procedimiento es particularmente adecuado para analizar pequeños volúmenes de muestra. Por lo tanto, en una realización de la divulgación, el recién nacido es un recién nacido, como un recién nacido prematuro nacido a las 20 y 43 semanas de gestación, tal como entre las 20 y 42 semanas de gestación, como entre 20 y 41 semanas, como entre las 20 y 40 semanas, tal como entre 20 y 39 semanas de gestación, como entre 21 y 38 semanas, como entre 23 y 37 semanas, como entre 24 y 37 semanas, como entre 25 y 37 semanas, como entre 26 y 37 semanas, como 55 entre 27 y 37 semanas, como entre 28 y 37 semanas, como entre 29 y 38 semanas, como entre 30 y 39 semanas, como entre 31 y 39 semanas, como entre 32 y 39 semanas, como entre 33 y 39 semanas, como entre 34 y 39 semanas, como entre 35 y 39 semanas, como entre 36 y 39 semanas, como entre 37 y 39 semanas, como entre 38 y 39 semanas, como 38 y 40 semanas, como entre 38 y 41 semanas, como antes de las 42 semanas de gestación, 60 como antes de las 43 semanas de gestación.

Es ventajoso realizar el análisis lo más rápido posible después del nacimiento para comenzar la medicación lo antes posible, si corresponde. Así, en una realización de la divulgación, la muestra se obtiene de un recién nacido antes de 24 h posnatales, preferentemente antes de 20 h posnatales, más preferentemente antes de 12 h posnatales, más preferentemente antes de 5 h posnatales, más preferentemente antes de 4 h posnatales, más preferentemente antes de 3h postnatal, más preferentemente antes de 2h postnatal, más preferentemente antes de 1h postnatal, más preferentemente antes de 30 minutos postnatales, más preferentemente antes de 20 minutos postnatales, más preferentemente antes de 10 minutos postnatales, más preferentemente antes de 5 minutos postnatales, más preferentemente antes de 4 minutos postnatales, más preferentemente antes de 3 minutos postnatales, más preferentemente antes de 2 minutos postnatales, más preferentemente antes de 1 minuto postnatal.

Si bien pueden obtenerse diversos biomarcadores a partir de diversos fluidos corporales o tejidos según el propósito, se prefiere que la muestra se obtenga de aspirado gástrico cuando el primer grupo de compuestos es lecitina y el segundo grupo de compuestos es esfingomielina. En una realización de la divulgación, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en aspirado gástrico, fluido traqueal, secreción hipofaríngea, fluido amniótico, sangre, suero y plasma. En una realización preferida de la divulgación, el fluido corporal es aspirado gástrico.

Si la muestra se obtiene de líquido amniótico, se debe tener cuidado para evitar la contaminación del líquido amniótico. En una realización de la divulgación, la muestra se obtiene de un sujeto, tal como un ser humano, por ejemplo, una hembra, tal como una hembra embarazada.

Las posibilidades de recoger líquido amniótico no contaminado o esencialmente no contaminado son buenas en relación con la cesárea. Por lo tanto, en una realización de la divulgación, el sujeto es un ser humano femenino, que se somete, o está a punto de someterse, a una cesárea. En una realización adicional de la divulgación, la muestra de fluido corporal es un líquido amniótico recogido del ser humano femenino, durante o inmediatamente después de la cesárea.

Como se mencionó anteriormente, el presente procedimiento permite volúmenes de muestra muy pequeños. Por lo tanto, en una realización de la divulgación, el volumen de la muestra es menos de 100 μl , más preferentemente menos de 90 μl , más preferentemente menos de 80 μl , más preferentemente menos de 70 μl , más preferentemente menos de 60 μl , más preferentemente menos de 50 μl , más preferentemente menos de 45 μl , más preferentemente menos de 40 μl , más preferentemente menos de 35 μl , más preferentemente menos de 35 μl , más preferentemente menos de 30 μl , más preferentemente menos de 25 μl , más preferentemente menos de 20 μl , más preferentemente menos de 19 μl , más preferentemente menos de 18 μl , más preferentemente menos de 17 μl , más preferentemente menos de 16 μl , más preferentemente menos de 15 μl , más preferentemente menos de 14 μl , más preferentemente menos de 13 μl , más preferentemente menos de 12 μl , más preferentemente menos de 12 μl , tal como alrededor o menos de 10 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 9,5 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 9 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 8,5 μl de fluido corporal, como alrededor de o menos de 8 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 7,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 7 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 6,5 μl de fluido corporal, como alrededor de o menos de 6 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 5,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 4,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 4 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 3,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 3 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 2,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 2 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 1,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 1 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 0,9 μl de fluido corporal, tal como alrededor o menos de 0,8 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,7 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,6 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,5 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,4 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,3 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,2 μl de fluido corporal, como alrededor o menos de 0,1 μl de fluido corporal.

Una ventaja adicional del presente procedimiento en relación con los procedimientos del estado actual de la técnica es que no se requiere preparación de la muestra antes de realizar el análisis. Así, en una realización de la divulgación, la muestra de fluido corporal se transfiere directamente del sujeto mediante un medio de muestreo, al medio de análisis sin preparación intermedia de la muestra.

Aunque es una ventaja para fines de diagnóstico rápido evitar la preparación de muestras, en ciertas realizaciones de la divulgación, el procedimiento comprende además la etapa de filtrar, centrifugar, sonificar por ultrasonidos o diluir la muestra antes de cargar la muestra en los medios de muestreo.

El análisis puede realizarse por cualquier medio de análisis adecuado conocido por los expertos en la técnica, sin

embargo, en una realización preferida de la divulgación, el medio de análisis es un espectrómetro de infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR), tal como un espectrómetro Bruker Alpha FT-IR, un espectrómetro Bruker Optics Tensor 27 FTIR o un espectrómetro Perkin Elmer o cualquier espectrómetro adecuado para el propósito de la presente divulgación, es decir, un espectrómetro capaz de acomodar y medir con precisión volúmenes de muestra muy pequeños, tales como volúmenes de muestra de hasta 1 µl. El espectrómetro puede estar equipado con un equipo accesorio según el propósito y las características específicas del análisis. En una realización de la divulgación, los medios de análisis comprenden además una unidad de muestra de Micro BioLytic AquaSpe. Para medir volúmenes pequeños es importante poder cargar adecuadamente la muestra en la vía óptica. En una realización de la divulgación, la longitud de la vía óptica está entre 5 y 10 µm, tal como 8,5 µm.

Los medios de análisis del procedimiento pueden enfriarse para obtener un rendimiento óptimo. Por lo tanto, en una realización de la divulgación, los medios de análisis comprenden una unidad detectora de telurio de mercurio y cadmio enfriada con nitrógeno. En una realización de la divulgación, los medios de análisis comprenden además una unidad MicroBioLytics 45w53D*28H.

La longitud de onda de los medios de análisis puede estar modificada. En una realización de la divulgación, la cantidad del primer, segundo y/o tercer grupo de compuestos se determina en el intervalo infrarrojo de longitud de onda media mediante un espectrómetro FTIR.

20 **Procedimiento implementado por ordenador**

El presente procedimiento puede implementarse al menos parcialmente en un ordenador. Por lo tanto, una realización adicional de la divulgación se relaciona con un procedimiento implementado por ordenador para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto según datos espectrales adquiridos a partir de una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, donde el procedimiento comprende los pasos de:

- a) determinar la actividad y/o concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra mediante el análisis de dichos datos espectrales, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- b) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos,
- c) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

Por lo tanto, el presente procedimiento puede integrarse en un ordenador personal o puede efectuarse desde un sitio web, teléfono móvil, teléfono inteligente u otro dispositivo electrónico capaz de ejecutar un código de ordenador. Una realización adicional de la divulgación, por lo tanto, se refiere a un producto de programa informático que tiene un medio legible por ordenador, donde dicho producto de programa informático es adecuado para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto basándose en datos espectrales adquiridos a partir de una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, donde dicho producto de programa informático comprende medios para llevar a cabo todos los pasos del procedimiento aquí descrito. Como el tiempo puede ser un problema en el diagnóstico de la presente divulgación, el diagnóstico puede integrarse ventajosamente en un sistema de diagnóstico que puede instalarse en servicios hospitalarios, tales como el servicio de neonatología, preferentemente en la sala de parto. Dicho sistema puede integrar la espectroscopia, el análisis y la indicación de la enfermedad que puede proporcionar una indicación de la enfermedad en unos minutos después de que se haya obtenido una muestra biológica. Una realización adicional de la divulgación, por lo tanto, se refiere a un sistema para diagnosticar una enfermedad respiratoria de un sujeto según una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto, que comprende

- un espectroscopio para medir datos espectrales de dicha muestra,

- medios de procesamiento configurados para

- a) determinar la actividad y/o concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra mediante el análisis de dichos datos espectrales, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- b) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos,
- c) correlacionar dicha relación con una relación de control, y
- d) indicar si la proporción es distinta a la proporción de control, donde una diferencia predefinida es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

El sistema puede ser parte de un sistema de monitorización sanitaria como se describe en el documento WO

2008/019695, que describe un servicio de monitorización sanitaria basado en un servidor central, donde la medición de las muestras biológicas se realiza como una medición local y los datos de medición son posteriormente enviados a un servidor central, donde los datos se procesan y analizan, por ejemplo, mediante sistemas de conocimiento experto, y se genera un perfil sanitario que se envía de vuelta al sistema local. Por lo tanto, los medios de procesamiento pueden estar integrados total o parcialmente en un servicio central a distancia del servicio del hospital local o incluso a distancia del hospital. Sin embargo, los medios de procesamiento también pueden estar completamente integrados en el sistema local, de modo que el sistema ubicado en el departamento del hospital incluya espectrómetro, análisis espectral y procesamiento e indicación de la enfermedad.

10 Usos médicos / Procedimientos de tratamiento

Según los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente en este documento, se puede lograr un tratamiento rápido del individuo que lo necesite, lo que resulta en una mejor tasa de supervivencia del individuo. La divulgación es particularmente adecuada para diagnosticar y tratar a un recién nacido, como un bebé prematuro.

15 Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de SDR en un individuo recién nacido, donde el procedimiento comprende las etapas de:

- a) proporcionar menos de 30 μ L de una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,
- 20 b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
- 25 e) si la proporción de d) es inferior a $2,0 \pm 0,5$, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tensioactivo al individuo recién nacido.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de SDR en un individuo recién nacido, donde el procedimiento comprende las etapas de:

- 30 a) proporcionar menos de 30 μ L de una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,
- b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- 35 c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
- e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del tensioactivo al individuo recién nacido, si la proporción determinada en el paso d) es menor que $2,0 \pm 0,5$.

40 En un aspecto, la descripción se refiere al uso de tensioactivo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de SDR en un individuo recién nacido que comprende las etapas de:

- a) proporcionar menos de 30 μ L de una muestra de fluido corporal obtenida del individuo recién nacido,
- 45 b) determinar en la muestra de a), mediante medios de análisis, la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
- d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
- 50 e) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del tensioactivo al individuo recién nacido, si la proporción determinada en el paso d) es menor que $2,0 \pm 0,5$.

Mientras que la relación crítica para determinar si el sujeto padece SDR es normalmente 2,0, la relación crítica entre lecitina y esfingomielina puede ser 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 o 2,5, bajo las cuales proporciones críticas se considera que el sujeto padece síndrome de dificultad respiratoria (SDR).

55 Referencias

- 1. Dorland's Medical Dictionary - "Neonatal respiratory distress syndrome"
- 2. Rodriguez RJ, Martin RJ, y Fanaroff, AA. (2002) Neonatal-perinatal medicine: Diseases of the fetus and infant; 7th ed. (2002):1001-1011. St. Louis: Mosby.

- 3.Kamper J, Wulff K, Larsen C, Lindequist S.(1993) Acta Paediatr;82:193-197.
 4.Polin RA, Sahni R.(2002) Semin Neonatol 7:739-789.
 5.Verder H.(2007) Acta Pædiatr 96:482-484.
 6.Verder H, Albertsen P, Ebbesen F, Greisen G, Robertson B, Bertelsen A, Agertoft L, Djernes B, Nathan E, Reinholdt J. (1999) Pediatrics 103:e24.
 7.Sandri F, Plavka R, Ancora G, Simeoni U, Stranak Z, Martinelli S, Mosca F, Nona J, Thomson, M, Verder H, Fabbri L, Halliday H.(2010) Pediatrics 125:e140.
 8.Bevilacqua G, Parmagiani S, Robertson B.(1996) J Perinat Med 24:1-12.
 9.Verder H., "Prænatal bestemmelse af lungematuriteten og forebyggelse af idiopatisk respiratory distress syndrom.Lecithinsphingomyelin ratio i amnionvæsken" Doctoral dissertation 27 November 1980 at University of Copenhagen.
 10.Soll RF.(1999) Cochrane Database Syst Rev 4:CD001456.
 11.Stevens TP, Blennow M, Meyers EH, Soll R.(2007) Cochrane Database Syst Rev 2007;4:CD003063.
 12.Verder H, Robertson B, Greisen G, Ebbesen F, Albertsen P, Lundstrøm K, Jacobsen T.(1994) N Engl J Med 331:1051-1055.
 13.Soll RF.(2012) Neonatology 102:169-171.
 14.Van Kaam AH, Jaegere AP, Borensztajn D, Rimensberger PC (2011) Neonatology 100:71-77.
 15.Liu K-Z, Dembinski TC, Mantsch HH (1998) Prenatal Diagnosis 18:1267-1275

20 EJEMPLOS

Los ejemplos que no se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención.

25 *Antecedentes*

La presente sección de antecedentes recapitula el estado de la técnica:

- El SDR moderado-grave progresará sin tratamiento
- 30 • El tensioactivo temprano es mejor que el tardío y la profilaxis es insuficiente
- Faltan los criterios comunes para la identificación de niños con SDR que necesitan tensioactivo y el momento de este tratamiento
- Existe la necesidad de un procedimiento rápido para identificar qué bebés necesitan tensioactivo y se les debe administrar este tratamiento de manera temprana.

35

Procedimientos existentes para "el momento"

- La edad gestacional no es útil (solo el 50 % de los recién nacidos <30 semanas necesitan tensioactivo)
- Los niveles de FiO₂ y de saturación de oxígeno no son ideales y no están estrechamente relacionados con el nivel de tensión de oxígeno a/APO₂ y parámetros útiles similares no siempre están disponibles y el tiempo de diagnóstico es demasiado largo (≥5 h en la mediana)
- 40 • La prueba de microburbujas, los recuentos de cuerpos lamelares y las pruebas similares a las de madurez pulmonar realizadas en aspirado gástrico (GAS) son sensibles a la dilución o dependen de volúmenes relativamente altos y pericia individual
- 45 • Al utilizar los recuentos de cuerpos lamelares como indicadores de la madurez pulmonar y la terapia con tensioactivo temprana en recién nacidos muy prematuros, es posible reducir la necesidad de suplementos de oxígeno y mejorar la oxigenación a las 6 h y 28 días de vida

Relación *lecitina - esfingomielina [L/S]*

50

- El procedimiento no es sensible a la dilución y la relación L/S <2,0 en el líquido amniótico se correlaciona con el desarrollo de SDR con alta sensibilidad y especificidad
- La relación L/S en GAS también se correlaciona con el desarrollo de SDR
- 55 • Los procedimientos L/S anteriores se han realizado mediante cromatografía de capa fina (TLC) con resultados después de ≥4 h
- La relación L/S realizada en GAS medida por espectroscopia infrarroja de Transformada de Fourier (FTJR) se puede realizar en volúmenes pequeños y es un procedimiento muy rápido

60 **Ejemplo 1: Momento de tratamiento con tensioactivo**

Procedimientos

5 El aspirado gástrico de 40 recién nacidos con edad gestacional de 27 a 41 semanas se congeló a -20 °C y se analizó más tarde. Antes de los análisis, los aspirados gástricos se mezclaron 5 segundos mediante un mezclador vórtex y se colocaron 50 µl en un espectrómetro Tensor 27 FTIR de Bruker Optics con una unidad BioATR de Micro Biolytics Inc.

Resultados

10 Se midieron distintas concentraciones de kits de ensayo de lecitina y esfingomielina de Cayman Chemical, AH-Diagnostics mediante un instrumento Konelab Prime 30i.

15 Los valores de lecitina y esfingomielina se midieron con el instrumento FTIR con buenos resultados en comparación con los valores estándar. La relación L/S se determinó satisfactoriamente con la correlación de R2 entre los valores medidos y los calculados y la validación cruzada R210 veces.

Conclusión

20 Los valores L/S medidos por FTIR pueden estar disponibles en unos pocos minutos y pueden utilizarse en la sala de parto como guía para el tratamiento con tensioactivo.

Ejemplo 2: La presente divulgación en un entorno clínico

25 Cuando un bebé prematuro nace muy temprano, se inicia el tratamiento con oxígeno y nCPAP. La VM solo se administra a recién nacidos que no pueden respirar (<5 % de los prematuros).

30 El siguiente paso es la recolección de aspirado gástrico <45 minutos después del nacimiento a través de un tubo de alimentación (CH 6-8) y una jeringa. Se deben probar distintas posiciones del tubo para encontrar cantidades suficientes de aspirado gástrico.

35 Una vez obtenida la muestra de aspirado gástrico, la medición de la relación L/S se realiza espectroscópicamente, preferentemente ya en la sala de parto para ahorrar tiempo. Se requieren 1-3 µl de aspirado gástrico. La relación L/S se obtiene en 5-10 minutos utilizando el procedimiento de la presente divulgación. Una relación L/S inferior a aproximadamente 2,0, tal como por debajo de 1,8-2,2, por ejemplo, por debajo de 1,9-2,1, por ejemplo, por debajo de 1,5-2,5 indica pulmones inmaduros y desarrollo de SDR, y por lo tanto el paciente debe obtener un tratamiento con tensioactivo. Los mejores resultados clínicos se obtienen si el tensioactivo se administra tan pronto como sea posible después del nacimiento.

40 Después de diagnosticar al paciente con pulmones inmaduros y el desarrollo de SDR usando el procedimiento de la presente divulgación, se administra tensioactivo al paciente. El procedimiento principal de administración de tensioactivo es INSURE para los recién nacidos tratados con nCPAP, mientras que para los recién nacidos tratados con VM, el tensioactivo se administra en el tubo intratraqueal, por ejemplo, a través de un catéter delgado y una jeringa.

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar el síndrome de dificultad respiratoria (SDR), el procedimiento comprende los pasos de:
- 5 a) proporcionar menos de 100 µl de una muestra de aspirado gástrico obtenida de un sujeto,
 b) determinar en la muestra de a), mediante un espectrómetro de infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR), la cantidad de al menos un primer y al menos un segundo grupo de compuestos, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos,
- 10 c) obtener una relación entre el primer y el segundo grupo de compuestos de b),
 d) correlacionar la proporción de c) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.
 donde el primer compuesto es lecitina o lecitina saturada y el segundo compuesto es esfingomielina, y donde las etapas de b) a d) del procedimiento se realizan en menos de 10 minutos, tal como en menos de 5 minutos.
- 15 2. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar la cantidad de un tercer compuesto seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilglicerol, hemoglobina, apohemoglobina, hemo y porfirina, preferentemente fosfatidilglicerol o hemoglobina.
- 20 3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad del primer compuesto, por lo que se obtiene así una cantidad corregida de fondo del primer compuesto.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la
 25 etapa de restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad del segundo compuesto, por lo que se obtiene así una cantidad corregida de fondo del segundo compuesto.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la
 30 etapa de restar la cantidad del tercer compuesto a la cantidad tanto del primer como del segundo compuesto, por lo que se obtiene así una cantidad corregida de fondo tanto del primer como del segundo compuesto.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad del compuesto se determina midiendo la actividad y/o la concentración del compuesto.
- 35 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto es un ser humano seleccionado del grupo que consiste en un bebé, un recién nacido y un bebé prematuro, preferentemente un recién nacido.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra se ha
 40 obtenido de un recién nacido antes de 24 h posnatales, preferentemente antes de 20 h posnatales, más preferentemente antes de 12 h posnatales, más preferentemente antes de 5 h posnatales, más preferentemente antes de 4 h posnatales, más preferentemente antes de 3 h posnatales, más preferentemente antes de 2 h posnatales, más preferentemente antes de 1 h posnatales, más preferentemente antes de 30 minutos posnatales, más preferentemente antes de 20 minutos posnatales, más preferentemente antes de 10 minutos posnatales, más
 45 preferentemente antes de 5 minutos posnatales, más preferentemente antes de 4 minutos posnatales, más preferentemente antes de 3 minutos posnatales, más preferentemente antes de 2 minutos posnatales, más preferentemente antes de 1 minuto posnatal.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra de
 50 aspirado gástrico se transfiere directamente del sujeto mediante un medio de muestreo al FTIR sin preparación intermedia de la muestra, o que comprende además la etapa de filtrar, centrifugar, sonicar y/o diluir la muestra antes de cargar la muestra en los medios de muestreo.
10. Un procedimiento implementado por ordenador para diagnosticar SDR basado en datos espectrales
 55 adquiridos a partir de una muestra de aspirado gástrico obtenida de dicho sujeto, donde dicha muestra tiene un volumen inferior a 100 µl, el procedimiento comprende los pasos de:
- a) determinar la actividad y/o concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra mediante el análisis de dichos datos espectrales utilizando un espectrómetro infrarrojo Transformada de Fourier
 60 (FTIR), donde el primer compuesto es lecitina o lecitina saturada y el segundo compuesto es esfingomielina,

b) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos,
c) correlacionar la proporción de b) con una proporción de control, donde una proporción distinta de la proporción de control es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

5 11. El procedimiento implementado por ordenador de la reivindicación 10, que comprende además las características de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Uso de un sistema en un procedimiento de diagnóstico de SDR según la reivindicación 1, donde dicho sistema comprende

10

- un espectroscopio para medir datos espectrales de dicha muestra,

- medios de procesamiento configurados para

15 a) determinar la actividad y/o la concentración de un primer y segundo grupo de compuestos en dicha muestra mediante el análisis de dichos datos espectrales, donde el primer grupo de compuestos es distinto al segundo grupo de compuestos y el primer compuesto es lecitina o lecitina saturada y el segundo compuesto es la esfingomielina,

b) calcular una relación entre las actividades y/o concentraciones del primer y segundo grupo de compuestos, y

c) correlacionar dicha relación con una relación de control, y

20 d) indicar si la proporción es distinta a la proporción de control, donde una diferencia predefinida es indicativa de una enfermedad respiratoria del sujeto.

13. Tensioactivo para uso en un procedimiento de tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en un individuo recién nacido, el procedimiento comprende los pasos de:

25

a) realizar el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para diagnosticar SDR en el individuo recién nacido;

b) se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del tensioactivo al individuo recién nacido, si la proporción determinada en el paso d) es menor que 2,5, tal como menor que 2,2, tal como menor que $2,0 \pm 0,5$, tal como menor

30 que 1,0.

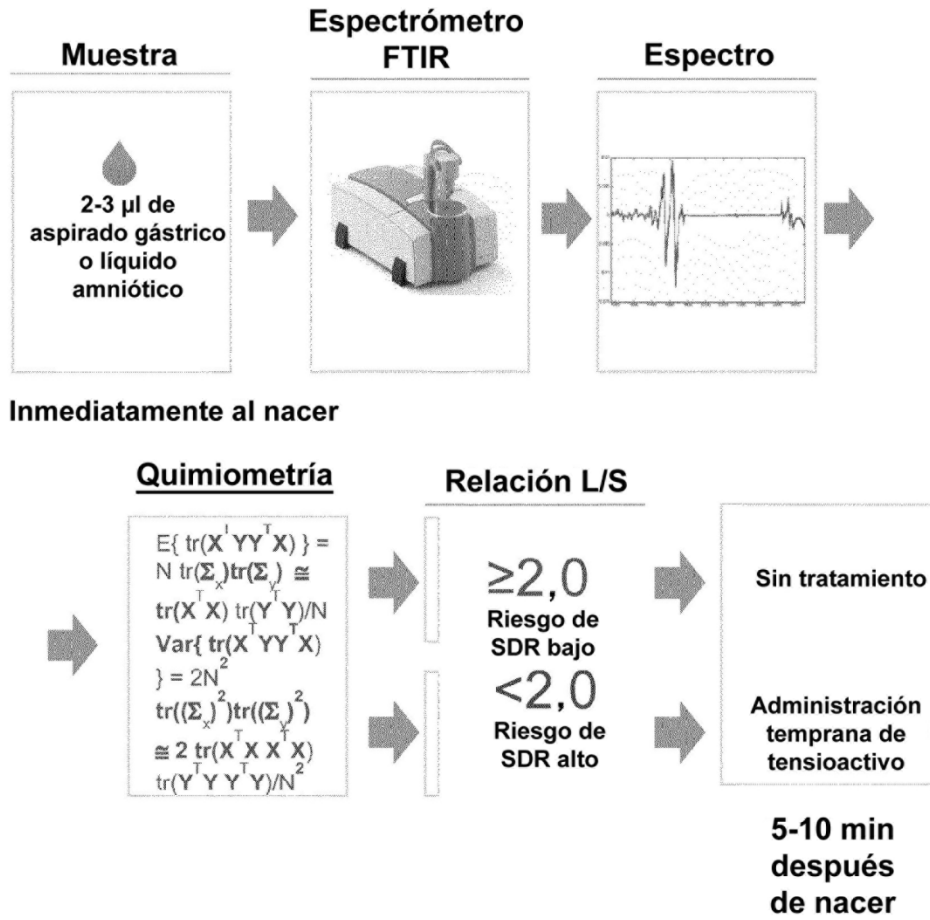


Fig. 1

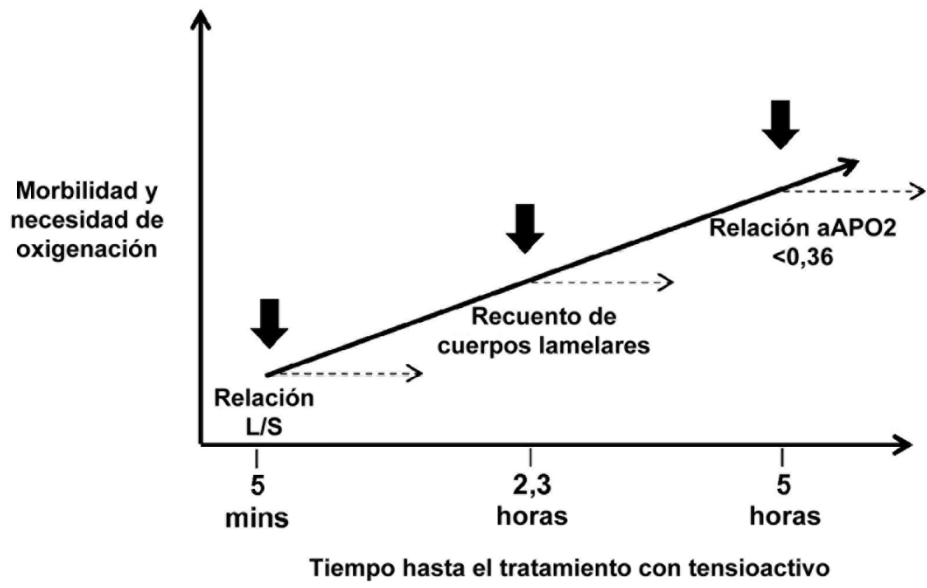


Fig. 2

Alta precisión

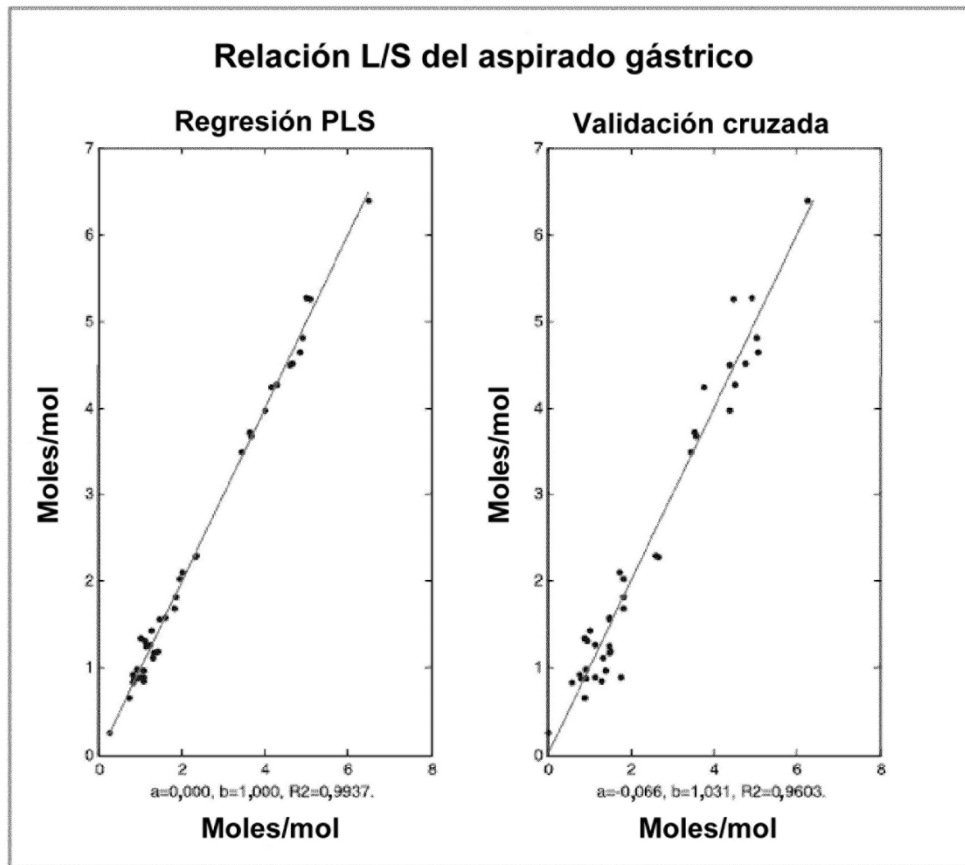


Fig. 3