

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2010.05.18</b>	(73) Titular(es): <b>TECHNISCHE UNIVERSITÄT GRAZ</b> <b>RECHBAUERSTRASSE 12 8010 GRAZ</b> AT <b>FORSCHUNGSHOLDING TU GRAZ GMBH</b> AT <b>MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ</b> AT
(30) Prioridade(s): <b>2009.05.18 EP 09160557</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.03.28</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2016.09.14</b> <b>245/2016</b>	(72) Inventor(es): <b>GEORG GÜBITZ</b> AT <b>EVA WEHRSCHÜTZ-SIGL</b> AT <b>ANDREA HASMANN</b> AT <b>BARBARA BINDER</b> AT <b>MICHAEL BURNETT</b> DE
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA DETECTAR INFECCÕES NUMA FERIDA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA DETECTAR INFECCÕES NUMA FERIDA COMPREENDENDO OS PASSOS DE: - COLOCAR UMA AMOSTRA OBTIDA A PARTIR DE UMA FERIDA EM CONTACTO COM PELO MENOS DOIS SUBSTRATOS DE PELO MENOS DUAS ENZIMAS SELECIONADAS A PARTIR DO GRUPO CONSISTINDO EM LISOZIMA, ELASTASE, CATEPSINA G E MIELOPEROXIDASE E ; DETECTAR INFECCÕES NUMA FERIDA QUANDO FOR DETERMINADA UMA CONVERSÃO DOS PELO MENOS DOIS SUBSTRATOS COM AS PELO MENOS DUAS ENZIMAS.

**RESUMO**

**"MÉTODOS PARA DETECTAR INFECÇÕES NUMA FERIDA"**

A presente invenção refere-se a um método para detectar infecções numa ferida compreendendo os passos de:

- colocar uma amostra obtida a partir de uma ferida em contacto com pelo menos dois substratos de pelo menos duas enzimas seleccionadas a partir do grupo consistindo em lisozima, elastase, catepsina G e mieloperoxidase e
- detectar infecções numa ferida quando for determinada uma conversão dos pelo menos dois substratos com as pelo menos duas enzimas.

**DESCRIÇÃO****"MÉTODO PARA DETECTAR INFECÇÕES NUMA FERIDA"**

A presente invenção refere-se a um método para detectar infecções numa ferida.

A cura de uma ferida é o processo natural do corpo para regenerar o tecido dérmico e epidérmico. Um conjunto de acontecimentos celulares e bioquímicos complexos tem lugar numa cascata intimamente orquestrada para reparar os tecidos danificados, enquanto as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação se sucedem no tempo. As acções coordenadas das populações de células, tanto residentes como migratórias, contidas no ambiente da matriz extracelular são essenciais para a restauração da continuidade e da função anatómica. A cura de feridas graves exige que uma variedade de actividades celulares, incluindo fagocitose, quimiotaxia, mitogénese, síntese do colagénio e a síntese de outros componentes matriciais, se completem de maneira coordenada e devam terminar no prazo de 3 meses.

Como o processo de cura de uma ferida é muito susceptível a interrupções, várias causas, incluindo infecções, idade avançada, diabetes e doença venosa ou arterial, conduzem à formação de feridas crónicas, que não saram. Em

contraste com uma ferida aguda, estas feridas crónicas não saram de maneira atempada e ordenada. Embora a ulceração crónica possa afectar qualquer região anatómica, o ponto mais comum é o membro inferior. A prevalência estimada de ulceração numa perna activa na Europa é de pelo menos 0,1-0,3 por cento. As úlceras secundárias a hipertensão venosa e a insuficiência venosa representam quase 70% de todas as úlceras na perna, contribuindo a diabetes e a doença arterial para uma proporção significativa do resto.

Em geral, a cura de uma ferida é regulada por uma multiplicidade de bio moléculas, incluindo citocinas, factores de crescimento e enzimas. Numa ferida crónica, o processo normal de cura é interrompido num ou mais pontos, principalmente nas fases inflamatória ou proliferativa. Devido à importância no processo de cura, as alterações nos níveis de factores de crescimento ou enzimas podiam responder pela cura prejudicada que se observa nas feridas crónicas. Nas fases de cura de feridas normais, a produção e a actividade das proteases estão firmemente reguladas. Contudo, nos fluidos de feridas crónicas, os níveis de várias proteases, incluindo a catepsina G e a elastase neutrofílica que é capaz de degradar a fibronectina, uma proteína essencial envolvida na remodelação do *ECM*, também se observou serem significativamente mais elevadas em feridas crónicas. Além disso, certos factores de crescimento parecem ser degradados pelas proteases que são segregadas principalmente por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares.

A par do desequilíbrio dos factores de crescimento e das enzimas, a infecção bacteriana é uma causa muito comum nas feridas crónicas. Visto as bactérias competirem por nutrientes e oxigénio com macrófagos e fibroblastos, a infecção bacteriana pode atrasar ou até parar a cura normal de feridas. A infecção é o resultado de quando as bactérias acabam por dominar os factores sistémicos e locais da resistência do hospedeiro. Isto provoca uma resposta sistémica séptica e também inibe os processos múltiplos envolvidos na cura de feridas. A par do número relativo de microrganismos e da sua patogenicidade, a resposta do hospedeiro e factores tais como imunodeficiência, diabetes mellitus e medicamentos, determinam se uma ferida crónica se torna infectada ou mostra sinais de cura retardada. Além de uma carga bacteriana cada vez maior, a formação de biopelícula e a presença de organismos resistentes a múltiplos medicamentos é detectada nas feridas crónicas.

Como a infecção não resulta apenas de uma fase inflamatória prolongada, mas também pode provocar mais necrose da ferida e pode até levar à morte como consequência de sépsis, os médicos deveriam ser capazes de responder à infecção rapidamente. Os actuais métodos de identificar a infecção bacteriana baseiam-se principalmente na avaliação do odor e da aparência da ferida. Só por meio de peritos (por exemplo, médicos), é possível identificar a infecção de uma ferida por sinais como vermelhidão, dor ou mau odor.

Na maioria dos casos, fazem-se esfregaços e os microrganismos são identificados por cultivo. Os resultados desta análise estão disponíveis só passado(s) 1-3 dias. Adicionalmente, como a contaminação e colonização das feridas é bastante normal, a informação acerca do tipo de espécies presentes nas feridas não é uma indicação fiável para as infecções de feridas. Factores críticos são: elevados níveis de conteúdo bacteriano, bactérias capazes de alterar as suas características fenotípicas e genotípicas, presença de organismos resistentes a múltiplos medicamentos e formação de biopelícula. Além disso, a virulência dos patogénios é importante, nomeadamente a produção de endo- e exotoxinas, que podem ser muito prejudiciais para o hospedeiro. Como a utilização de cotonetes só pode dar informações acerca do tipo de bactérias e acerca do número aproximado da carga bacteriana, a identificação das espécies bacterianas por métodos microbiológicos ou CPR não é um diagnóstico real de infecção. Além disso, o método é caro e leva pelo menos três dias.

Se se suspeitar infecção, os testes sanguíneos fornecem muitas vezes uma indicação do tratamento medicinal a seguir. Além da determinação da quantidade de células brancas no sangue (leucócitos), a concentração de proteína reactiva C (CPR) aumenta no caso de infecção. A CPR pertence à família das proteínas de fase aguda e tem um tempo de reacção muito curto (12 horas). As determinações de CPR têm, largamente, deslocado a determinação da

velocidade de sedimentação dos eritrócitos visto ser menos sensível e ter um intervalo superior a uma semana. Contudo, os níveis elevados de CPR são habitualmente medidos no sangue, o que exige a recolha de sangue e a análise num laboratório clínico.

Em resumo, estes métodos disponíveis levam tempo e não podem ser usados ao domicílio ou numa rápida avaliação durante as mudanças de penso. Por outro lado, a inspecção do odor e da aparência da ferida que podia indicar infecções exige médicos com experiência.

O pedido W00230478 divulga um sistema indicador, por exemplo, para pensos de feridas baseado em quitosano de substrato de lisozima e indicador de cor.

Portanto, há uma forte necessidade de um auxiliar de prognóstico rápido para o diagnóstico de infecção numa ferida antes dos óbvios sintomas clínicos de infecção. Uma ferramenta de diagnóstico desse tipo permitiria a intervenção precoce com tratamento adequado e iria reduzir a intervenção clínica e o uso de antibióticos. Também, esse método deveria ser simples e aplicável ao domicílio, por exemplo, por enfermeiros. Estes pré-requisitos exigem um diagnóstico rápido, em cerca de 10 a 30 minutos. É um objecto da presente invenção fornecer os métodos e os meios para satisfazer a necessidade atrás identificada.

A presente invenção refere-se a um método para

detectar a infecção numa ferida compreendendo os seguintes passos:

- colocar uma amostra obtida a partir de uma ferida em contacto com pelo menos três substratos de pelo menos três enzimas seleccionadas a partir de uma das seguintes combinações:

Lisozima, elastase e catepsina G, ou

Lisozima, elastase e mieloperoxidase, ou

Lisozima, catepsina G e mieloperoxidase e

- detectar uma infecção da ferida quando for determinada uma conversão dos pelo menos três substratos com as referidas pelo menos três enzimas e a referida conversão estiver aumentada (por exemplo, pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 100%, mais preferivelmente pelo menos 200%) comparada com a conversão do referido substrato numa ferida não infectada.

As feridas que são infectadas por microrganismos como bactérias ou fungos contêm enzimas específicas em maior quantidade comparadas com as feridas não infectadas. Em particular, a quantidade das enzimas lisozima, elastase, catepsina G e mieloperoxidase é aumentada nas feridas infectadas. A maior actividade de uma, preferivelmente de duas ou de todas as referidas enzimas numa ferida indica uma infecção.



A presente invenção fornece um método para o diagnóstico rápido e precoce de infecção numa ferida. Esta "ferramenta de diagnóstico rápido", como a designamos, baseia-se nas enzimas presentes no fluido de uma ferida que estão associadas a uma resposta inflamatória do corpo humano. A aplicação de substratos apropriados de enzimas, que são elevados no caso de infecção, podem conduzir, por exemplo, a uma reacção da cor dentro de minutos e permitem uma estimativa muito rápida do estado da ferida. A invenção compreende dispositivos possíveis baseados em níveis elevados de elastase, lisozima, catepsina G e mieloperoxidase como indicadores de uma possível infecção da ferida.

A lisozima (também conhecida como Muramidase) é uma enzima que compreende 129 resíduos de aminoácido com um peso molecular de aproximadamente 14,7 kDa. A lisozima é um componente de grânulos citoplásmicos dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e o maior produto secretor dos macrófagos, encontrado nas secreções e tecidos de mamíferos; e é sem dúvida uma das principais enzimas importantes do nosso sistema imune inato. Devido ao facto de a enzima destruir as paredes da célula bacteriana por hidrólise de 1,4-beta-ligações entre o ácido N-acetilmurâmico e os resíduos de N-acetil-D-glucosamina em peptidoglicano é comum ser referida como sendo o "antibiótico próprio do corpo". Além da sua actividade lítica contra as bactérias Gram positivas, a lisozima pode agir como uma opsonina inata não específica ligando-se à superfície bacteriana, reduzindo a carga negativa e facilitando a fagocitose da bactéria antes da

chegada das opsoninas provenientes do sistema imunitário adquirido. Níveis elevados de lisozima no soro estão descritos no caso de algumas doenças; adicionalmente, níveis elevados de lisozima poderiam ser detectados em amostras do fluido de feridas no caso de infecção.

Nos seres humanos, há dois genes para a elastase: a elastase pancreática (ELA-1) e a elastase neutrofílica (ELA-2). A elastase neutrofílica (ou elastase leucocitária LE:EC 3.4.21.37) é uma glicoproteína 30-kD que pertence à família da quimiotripsina das proteases de serina expressas por leucócitos polimorfonucleares (PMN). A NE madura, uma glicoproteína altamente catiónica, é destinada a grânulos primários onde é embalada com catepsina G (outra protease de serina neutrofílica).

A elastase neutrofílica intracelular é uma molécula efectora chave do sistema imunitário inato, com potente actividade antimicrobiana contra as bactérias Gram negativas, espiroquetas e fungos. Além do envolvimento no controlo de patogénios por degradação da membrana depois da internalização, localizou-se elastase neutrofílica cataliticamente activa na membrana de plasma dos neutrófilos maduros depois da libertação de armazenamento intracelular. Contudo, em pontos inflamatórios, a elastase neutrofílica é capaz de evitar a regulação e, uma vez desregulada, pode induzir a libertação de citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina-6 e a interleucina-8, resultando na destruição de tecidos e na inflamação que caracterizam

numerosas doenças. A elastina, que em conjunto com o colagénio, determina as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo, tem a propriedade única de retracção elástica e desempenha uma função estrutural da maior importância nos pulmões, artérias, pele e ligamentos. Portanto, o excesso de actividade LE tem estado envolvido em algumas condições patológicas que conduzem ao enfraquecimento da organização *ECM*, incluindo artrite reumatoide, enfisema hereditário, doença pulmonar obstrutiva crónica, síndrome de dificuldade respiratória adulta, enfisema por danos de reperfusão isquémica, fibrose quística e progressão tumoral. Níveis elevados de elastase podem ser observados mesmo no início da infecção e, portanto, a presença de elastase no fluido de feridas fornece um aviso precoce de infecção da ferida, antes de surgirem sinais clínicos óbvios de infecção.

A catepsina G é uma protease que pertence ao grupo das proteases de cisteína lisossómica com um tiol de cisteína nucleofílica numa tríade catalítica. Em conjunto com a elastase leucocitária humana e a proteínase 3, a catepsina G é um conteúdo da maior importância dos grânulos azurofílicos nos neutrófilos e é libertada em pontos de inflamação.

A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína da enzima peroxidase 150 kDa (Ec 1.11.1.7) que existe como um dímero consistindo em duas cadeias leves de 15 kDa e em duas cadeias pesadas glicosiladas de peso variável ligadas a um grupo heme protético. Esta proteína lisossómica é

armazenada em grânulos azurofílicos do neutrófilo. A MPO produz ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e anião de cloreto (Cl<sup>-</sup>) durante a explosão respiratória do neutrófilo. O ácido hipocloroso e o radical de tirosil são citotóxicos e são capazes de matar bactérias e outros patogénios. Enquanto a mortalidade por deficiência de MPO é inicialmente prejudicada mas atinge níveis normais depois de um período, sugerindo que um mecanismo alternativo e aparentemente mais lento de mortalidade pode incorporar neutrófilos deficientes em MPO, a elevada actividade da MPO no caso de infecção foi medida no sangue e nos tecidos. Isto parece dever-se à maior infiltração de neutrófilos no ponto infectado.

A invenção baseia-se nas reacções bioquímicas que provocam alterações de cor devidas à presença de quatro enzimas diferentes nas feridas a níveis elevados no caso de infecção. A avaliação de quatro enzimas diferentes podem compensar variações nas actividades enzimáticas individuais em fluidos de feridas potenciando a exactidão da ferramenta de diagnóstico.

Para aumentar a exactidão do método da presente invenção, a amostra é colocada em contacto com pelo menos três, preferivelmente pelo menos quatro, dos referidos substratos (compreendendo substrato para lisozima) permitindo a determinação da presença de pelo menos três, preferivelmente de todas as quatro enzimas (compreendendo lisozima) da presente invenção.

Os substratos usados no método da presente invenção são específicos para a lisozima, a elastase, a catepsina G e/ou a mieloperoxidase. É divulgado o uso de pelo menos dois dos referidos substratos específicos de enzima para determinar a sua presença aumentada em comparação com uma ferida não infectada. Combinações divulgadas dos substratos incluem substratos de lisozima e elastase, catepsina G e mieloperoxidase; lisozima e catepsina G; lisozima e mieloperoxidase; elastase e catepsina G; elastase e mieloperoxidase. As combinações inventivas dos substratos são substratos de lisozima, elastase e catepsina G; lisozima, elastase e mieloperoxidase; lisozima, catepsina G e mieloperoxidase. Estão também divulgados os substratos de elastase, catepsina G e mieloperoxidase.

A amostra obtida a partir da ferida pode ser o fluido da ferida, um penso da ferida compreendendo fluido da ferida ou um cotonete compreendendo fluido da ferida.

A presença e a quantidade de enzimas da presente invenção na ferida pode ser determinada pelo uso directo do fluido da ferida. Alternativamente podem ser usados os pensos ou cotonetes que tenham estado em contacto com o fluido da ferida.

Para determinar a presença de lisozima, elastase, catepsina G e/ou mieloperoxidase directamente num penso ou esfregaço da ferida, pelo menos três substratos (compreen-

dendo substrato para lisozima) são preferivelmente dispersos numa matriz de um polímero medicinalmente aceitável, preferivelmente um hidrogel baseado em alginato, peptidoglicano e ou ácido poligalacturónico, preferivelmente fornecido na forma de, por exemplo, uma película ou esferas e/ou ligadas a uma fibra, em particular a uma fibra de um penso ou esfregaço da ferida.

Um penso, cotonete ou bastão de diagnóstico, de uma ferida que é particularmente preferido pode compreender um suporte, uma matriz biodegradável, por exemplo, uma película monocamada ou multicamada ou esferas e uma barreira. O suporte pode ser um polímero como poliamida ou polipropileno. No referido suporte pode ser localizada uma matriz biodegradável. Esta matriz pode ser elaborada, por exemplo, como uma película (1-5 mm de espessura) ou esferas como uma mono- ou multicamada (2-8 mm de diâmetro).

O substrato das enzimas, em particular da lisozima e da elastase, pode ser um polímero ou biopolímero ou disperso nos referidos polímeros que podem ser degradados pelas referidas enzimas. Por exemplo, um polímero de peptidoglicano pode actuar como um substrato para lisozima e a elastina como um substrato da elastase. O polímero degradável pode compreender pelo menos um substrato ligado a pelo menos uma molécula marcadora como pelo menos um corante que é libertado no decorrer da degradação do substrato. Películas multicamada (por exemplo, pelo

menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas) ou esferas podem compreender uma matriz contendo o substrato para enzima rotulada que está coberta por um substrato para enzima não rotulada. Sobre a matriz de polímero biodegradável está localizada uma camada de barreira. A referida camada de barreira é uma membrana não degradável que evita que as substâncias da matriz biodegradável e o substrato e os substratos convertidos sejam libertados para o exterior. Contudo, a referida camada de barreira é permeável aos fluidos da ferida.

De acordo com um modelo de realização preferido da presente invenção, o substrato para lisozima é seleccionado a partir do grupo que consiste num peptidoglicano tingido, preferivelmente um peptidoglicano de *Micrococcus lysodeicti-kus*, e quitosano, ambos preferivelmente tingidos com um corante de vinilsulfona (por exemplo, Remazol).

O substrato para elastase é preferivelmente seleccionado a partir do grupo que consiste em N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida e Cisteami-da-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-pNA que é, preferivelmente, ligado directamente ao suporte ou à matriz.

De acordo com outro modelo de realização preferido da presente invenção, o substrato para catepsina G é seleccionado a partir do grupo que consiste em N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida e Cisteami-

da-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-pNA que, preferivelmente, está directamente ligada ao suporte ou à matriz.

De acordo com um modelo de realização preferido da presente invenção, o substrato para mieloperoxidase é seleccionado a partir do grupo que consiste em 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico, alcoxissilanureia e outros compostos como Fast Blue RR modificado com isocianato. Os substratos podem ser covalentemente immobilizados no sistema. O peróxido de hidrogénio pode estar presente como um co-substrato. A integração de celobiose desidrogenase (por exemplo, celobiose desidrogenase de *Myriococcum thermophilum*), mesilato de desferrioxamina e 5 a 500 mM, preferivelmente 10 a 200 mM, em particular 30 mM de celobiose como substratos, resulta na produção de peróxido de hidrogénio que é usada pela mieloperoxidase como um co-substrato. Claro que outros sistemas de enzima que envolvam outros substratos também podem ser usados para produzir peróxido de hidrogénio. A quantidade utilizada de substratos pode variar de substrato para substrato. Visto o método da presente invenção ser optimizado para uma rápida detecção de infecção numa ferida, a quantidade de substrato utilizado depende da velocidade da conversão da enzima e do ambiente (por exemplo, líquido, penso da ferida, cotonete, etc.) onde se dá a conversão.



A quantidade de substrato e de fluido de ferida a usar varia ainda consoante o método de detecção: fluido, em gel (matriz biodegradável), cotonete, penso da ferida, etc.

Num sistema de teste de líquido, a quantidade do substrato de elastase adicionado a uma amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30  $\mu\text{l}$ , ainda mais preferivelmente desde 80 até 150  $\mu\text{l}$ , de uma solução de substrato compreendendo de 0,05 até 5 mM, preferivelmente 0,05 até 2,5 mM, em particular 0,8 até 1,2 mM. Num modelo de realização particularmente preferido da presente invenção, 4 a 6  $\mu\text{l}$ , preferivelmente 5  $\mu\text{l}$ , de líquido da ferida são incubados com 90 até 110  $\mu\text{l}$ , preferivelmente 100  $\mu\text{l}$ , de uma solução de substrato compreendendo 0,8 até 1,2 mM, preferivelmente 1 mM de substrato de elastase, preferivelmente N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida.

Num sistema de teste de líquido a quantidade do substrato de catepsina G adicionado a uma amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30  $\mu\text{l}$ , preferivelmente entre 1 e 15  $\mu\text{l}$ , varia de 10 até 500  $\mu\text{l}$ , preferivelmente desde 20 até 400  $\mu\text{l}$ , mais preferivelmente desde 50 até 300  $\mu\text{l}$ , ainda mais preferivelmente desde 80 até 150  $\mu\text{l}$ , de uma solução de substrato compreendendo 0,1 até 10 mM, preferivelmente 0,5 até 5 mM, em particular 3 mM. Num modelo de realização particularmente preferido da presente invenção 4 a 6  $\mu\text{l}$ , preferivelmente 5  $\mu\text{l}$ , de líquido da ferida são incubados com 90 até 110  $\mu\text{l}$ , preferivelmente 100  $\mu\text{l}$ , de uma solução de substrato

compreendendo 2 a 4 mM, preferivelmente 3 mM de substrato de catepsina G, preferivelmente N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida.

Num sistema de teste de líquido a quantidade de substrato de mieloperoxidase adicionado a uma amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30  $\mu$ l, preferivelmente entre 1 e 15  $\mu$ l, varia de 10 até 500  $\mu$ l, preferivelmente desde 20 até 400  $\mu$ l, mais preferivelmente desde 50 até 300  $\mu$ l, ainda mais preferivelmente desde 80 até 150  $\mu$ l, de uma solução de substrato compreendendo 0,01 até 1 mM, preferivelmente 0,02 até 0,45 mM. Num modelo de realização particularmente preferido da presente invenção 4 a 6  $\mu$ l, preferivelmente 5  $\mu$ l, de líquido da ferida diluído 1:10 até 1:30, preferivelmente 1:20, são incubados com 90 até 110  $\mu$ l, preferivelmente 100  $\mu$ l, de uma solução de substrato compreendendo 2 a 4 mM, preferivelmente 3 mM de substrato de mieloperoxidase, preferivelmente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e/ou 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico), cristal violeta, 0,1 mm de leuco cristal violeta ou fenólicos naturais tais como ácido sináptico, alcoxissilanureia e Fast Blue RR modificado com isocianato.

A solução compreendendo os referidos substratos pode ainda compreender sacarose 0,1 até 0,5 M, preferivelmente 0,3 M, e 1 a 30  $\mu$ l, preferivelmente 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em vez de peróxido de hidrogénio, o sistema pode conter um peróxido de hidrogénio produtor de enzima a partir de

hidratos de carbono tais como glicose oxidase ou outra oxidase de hidrato de carbono tal como celobio-hidrolase (CBH).

Num sistema de teste de líquido a quantidade de substrato de lisozima adicionada a uma amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30  $\mu$ l, preferivelmente entre 1 e 15  $\mu$ l, varia de 1 até 25 mg, preferivelmente desde 5 até 20 mg, mais preferivelmente desde 8 até 10 mg, numa solução compreendendo tampão de 1 até 30 ml, preferivelmente 15 ml. Num modelo de realização particularmente preferido da presente invenção 4 a 6  $\mu$ l, preferivelmente 5  $\mu$ l, de líquido da ferida são incubados com 90 até 110  $\mu$ l, preferivelmente 100  $\mu$ l, de uma solução de substrato compreendendo substrato de lisozima, preferivelmente um peptidoglicano, mais preferivelmente um peptidoglicano de *Micrococcus lyso-deictikus*, e quitosano tingido, ambos preferivelmente tingidos com um corante de vinilsulfona (por exemplo, Remazol).

Num sistema de teste baseado em gel, para detectar a actividade da elastase e da catepsina G, adicionou-se 20 a 250  $\mu$ l, preferivelmente 50 até 150  $\mu$ l, mais preferivelmente 100  $\mu$ l de uma solução de substrato com 0,05 até 25 mM, preferivelmente 0,1 até 20 mM, a uma solução de gel (compreendendo, por exemplo, 1 até 2%, preferivelmente 1,5% de agarose) a 40 até 50°C, mais preferivelmente a 45°C, com um volume de 50 até 150  $\mu$ l, preferivelmente 100  $\mu$ l. Adicionou-se ao referido gel uma

amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30 µl, preferivelmente entre 1 e 15 µl.

Num sistema de teste baseado em gel, para detectar a actividade da mieloperoxidase adicionou-se um volume de 50 até 150 µl, mais preferivelmente 100 µl de uma solução usada para testar o líquido, ao mesmo volume de gel aquecido como atrás referimos. Adicionou-se ao referido gel uma amostra de líquido da ferida com um volume entre 0,5 e 30 µl, preferivelmente entre 1 e 15 µl.

Num sistema de teste baseado em gel, para detectar a actividade da lisozima suspendeu-se 5 a 100 mg, preferivelmente 10 a 75 mg, mais preferivelmente 15 até 50 mg de peptidoglicano, preferivelmente de *Micrococcus lyso-deictikus*, num gel aquecido, preferivelmente gel de agarose (compreendendo, por exemplo, 10 g de agarose numa concentração de aprox. 1% p/v). Alternativamente, o peptidoglicano é manchado com um corante como aqui descrito pelo aquecimento de um peptidoglicano juntamente com o corante até cerca de 60 até 70°C. O precipitado pode ser usado para testar a actividade de lisozima. Alternativamente, o sistema de teste baseado em gel compreende duas camadas de peptidoglicano manchado e sem ser manchado. No caso da degradação do peptidoglicano devido a actividade da lisozima, a cor alterar-se-ia de amarelo para azul.

Os sistemas de teste baseados em cotonetes são efectuados com as soluções atrás indicadas para os sistemas

de teste baseados em líquido. Os cotonetes a serem usados são capazes de absorver 0,5 até 20 µl, preferivelmente 1 até 15 µl, de fluido da ferida.

Se o sistema de teste for usado como um indicador em pensos de ferida, as soluções atrás referidas são trazidas para o penso e secas ou os substratos de enzimas são covalentemente ligados ao penso.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um penso para ferida ou cotonete que compreende pelo menos três substratos para pelo menos três enzimas seleccionadas a partir de uma das seguintes combinações: lisozima, elastase e catepsina G, ou lisozima, elastase e mieloperoxidase, ou lisozima, catepsina G e mieloperoxidase.

Um penso para ferida e um cotonete compreendendo os referidos pelo menos três substratos é particularmente vantajoso porque permite determinar directamente nos referidos penso e cotonete se a ferida está infectada ou não. Os substratos a usar desenvolvem preferivelmente uma cor quando convertidos por enzimas presentes numa amostra com a qual o referido penso ou cotonete entra em contacto. Alternativamente, também é possível fornecer no penso ou cotonete outras substâncias capazes de reagir com o substrato convertido.

Um penso para feridas que compreenda os referidos substratos e, eventualmente, um sistema para detectar a

conversão dos substratos pelas enzimas presentes numa ferida infectada é particularmente vantajoso porque permite monitorizar se uma ferida coberta pelo referido penso está infectada ou não. Consequentemente, qualquer pessoa pode decidir quando um penso para ferida tem de ser mudado.

O penso para ferida ou um sistema de diagnóstico, que pode estar posicionado na vizinhança de uma ferida em contacto com o fluido da ferida pode compreender uma camada de suporte, uma matriz em funcionamento e uma camada de barreira. Como camadas de suporte pode ser utilizada poli-amida ou polipropilenos enzimicamente funcionalizados. Para a matriz em funcionamento podem ser usadas diferentes misturas de geles, por exemplo, alginato/agarose e gelatina, com substratos de enzima incorporados, tais como peptidoglicano ou quitosano como substratos para lisozima. Por exemplo, quando a quantidade de lisozima é determinada, podem ser aplicadas combinações de agarose com várias quantidades de peptidoglicano, de 15 até 50 mg por 10 g de agarose/gelatina. A camada de barreira pode ser baseada numa membrana (com uma espessura de, por exemplo, 0,2  $\mu\text{m}$ ) para excluir o substrato convertido como material colorido a partir de fluidos da ferida, tais como eritrócitos. Uma resposta clara deste sistema à lisozima e aos fluidos da ferida pode ser obtida medindo a maior transparência a, por exemplo, 450 nm. Adicionalmente, no caso de elevadas actividades de lisozima, uma libertação do corante Remazol Brilliant Blue covalentemente ligado a peptidoglicano podia ser detectada por uma alteração de cor do sobrenadante para

azul, por uma alteração de cor do cotonete colocado no sistema para azul ou ser medido a 600 nm.

De acordo com um modelo de realização preferido da presente invenção, o penso ou cotonete compreende pelo menos três (compreendendo substrato para lisozima), em particular quatro, dos referidos substratos.

De acordo com outro modelo de realização preferido da presente invenção, os pelo menos três substratos são dispersos numa matriz de um polímero medicinalmente aceitável ou ligado a uma fibra.

Os pelo menos três substratos são preferivelmente seleccionados a partir do grupo consistindo em peptidoglicano, preferivelmente um peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* tingido com um corante de vinilsulfona, N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida, N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta ou outros fenólicos naturais tais como ácido sináptico, alcoxissilanureia e Fast Blue RR modificado com isocianato, desde que satisfaçam os requisitos das reivindicações 1 ou 10.

A presente invenção é ainda ilustrada nos exemplos que se seguem. Contudo, não se restringe aos mesmos.

**EXEMPLOS**Exemplo 1: Teste à base de elastase - sistema de líquido*Preparação do sistema de diagnóstico*

100 µL de uma solução de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida dissolvida a uma concentração de 20 mM em DMSO em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M) são colocados por meio de pipeta num tubo eppendorf transparente. A concentração final de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida pode estar entre 0,05 e 2,50 mM e, preferencialmente, está entre 0,80 e 1,20 mM.

*Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15 µL de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste, preferencialmente entre 4-6 µL e é misturado por sacudidura manual durante 10 segundos. Esta mistura é incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor, de rosa claro para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Amostras de 5 µL de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de



diagnóstico descrito em 1A contendo 1,0 mM de uma concentração de substrato de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida. A inspeção visual das amostras depois de 10 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>	<b>Actividade da elastase* U/mL</b>
A	Sim	Amarelo	Sim	3,5
B	Sim	Amarelo	Sim	3,4
C	Sim	Amarelo	Sim	4,1
D	Não	Sem alteração de cor	Não	0,4
E	Não	Sem alteração de cor	Não	0,3
F	Não	Sem alteração de cor	Não	0,4

\* medida com ensaio padrão à base de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida

### Exemplo 2: Teste à base de elastase - sistema à base de gel

#### *Preparação do sistema de diagnóstico*

N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida é dissolvida a uma concentração de 20 mM em dimetoxi-sulfóxido e diluída em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M). Uma concentração final de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida pode estar entre 0,2 e 15 mM e, preferencialmente, está entre 0,50 e 5,00 mM. 100 µL desta solução são apropriadamente misturados com igual volume de solução de agarose (1,5% p/v) aquecida (45°C) e transferida para cavidades de uma placa de 96 cavidades.

*Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15  $\mu$ L de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste, preferencialmente entre 4-6  $\mu$ L. Esta mistura é incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Amostras de 5  $\mu$ L de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 1B contendo uma concentração de substrato de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitro-anilida 5,0 mM. A inspeção visual das amostras depois de 10 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>
A	Sim	Amarelo	Sim
B	Sim	Amarelo	Sim
C	Sim	Amarelo	Sim
D	Não	Sem alteração de cor	Não
E	Não	Sem alteração de cor	Não
F	Não	Sem alteração de cor	Não

Exemplo 3: Teste à base de elastase - sistema à base de  
cotonete

*Preparação do sistema de diagnóstico*

N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida é dissolvida a uma concentração de 20 mM em dimetoxi-sulfóxido e diluída em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M). A concentração final de N-metoxi-succinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida pode estar entre 0,2 e 10 mM e, preferencialmente, está entre 0,50 e 5,00 mM. 40 µL desta solução foram introduzidas em placas de microtitulação por meio de pipeta.

*Diagnóstico*

Pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) mergulhados no fluido da ferida e absorvendo, assim, entre 1 e 12 µL de fluido de ferida, preferencialmente entre 5 e 8 µL. O sistema de teste é então colocado em placas de microtitulação contendo a solução de substrato e é incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor no cotonete (ou seja, no tecido de poliéster) para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Usando pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma

Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) foram recolhidas amostras de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) e foram colocados no sistema de diagnóstico descrito em 1C contendo uma concentração de substrato de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitro-anilida 1,0 mM. A inspeção visual das amostras depois de 10 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infeção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infeção de acordo com o teste</b>
A	Sim	Amarelo	Sim
B	Sim	Amarelo	Sim
C	Sim	Amarelo	Sim
D	Não	Sem alteração de cor	Não
E	Não	Sem alteração de cor	Não
F	Não	Sem alteração de cor	Não

Exemplo 4: Teste à base de catepsina - sistema de líquido

*Preparação do sistema de diagnóstico*

N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida é dissolvida a uma concentração de 20 mM em dimetoxissulfóxido e diluída em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M). A concentração final de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida pode estar entre 0,5 e 5 mM e, preferencialmente, é de 3 mM.

*Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15  $\mu\text{L}$  de fluido de ferida é adicionado ao sistema, preferencialmente entre 4-6  $\mu\text{L}$  e é misturado por sacudidura manual. Esta mistura é incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

5  $\mu\text{L}$  de amostras de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 1A compreendendo uma concentração de substrato de 3,0 mM de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida. A inspecção visual das amostras depois de 10 a 15 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta do teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>	<b>Catepsina G* U/mL</b>
A	Sim	Amarelo	Sim	40
B	Sim	Amarelo	Sim	36
C	Sim	Amarelo	Sim	45
D	Não	Sem alteração de cor	Não	3
E	Não	Sem alteração de cor	Não	2,5
F	Não	Sem alteração de cor	Não	3,5

\* medida com ensaio padrão à base de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida

Exemplo 5: Teste à base de catepsina - sistema à base de gel

*Preparação do sistema de diagnóstico*

N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida é dissolvida a uma concentração de 20 mM em dimetoxissulfóxido e diluída em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M). A concentração final de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida pode estar entre 0,5 e 10 mM e, preferencialmente, é de 5,00 mM. 100 µL desta solução são apropriadamente misturados com igual volume de solução (1,5% p/v) de agarose aquecida (45°C) e transferida para cavidades de uma placa de 96 cavidades.

*Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15 µL de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste, preferencialmente entre 4-6 µL. Esta mistura é incubada a 37°C durante 10 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

5 µL de amostras de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 1B contendo uma concentração de substrato de 5,0 mM de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-

nitro-anilida. A inspecção visual das amostras depois de 10 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>
A	Sim	Amarelo	Sim
B	Sim	Amarelo	Sim
C	Sim	Amarelo	Sim
D	Não	Sem alteração de cor	Não
E	Não	Sem alteração de cor	Não
F	Não	Sem alteração de cor	Não

Exemplo 6: Teste à base de catepsina - Sistema à base de cotonete

*Preparação do sistema de diagnóstico*

N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida é dissolvida a uma concentração de 20 mM em dimetoxissulfóxido e diluída em tampão HEPES 0,1 M (pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M). A concentração final de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida pode estar entre 0,5 e 10 mM e, preferencialmente, é de 5,00 mM. 40 µL desta solução foram introduzidos em placas de microtitulação por meio de pipeta.

*Diagnóstico*

Pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) mergulhados no fluido da

ferida e absorvendo, assim, entre 1 e 12  $\mu\text{L}$  de fluido de ferida, preferencialmente entre 5 e 8  $\mu\text{L}$ . O sistema de teste é então colocado em placas de microtitulação contendo a solução de substrato e é incubado a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor no cotonete (ou seja, no tecido de poliéster) para amarelo. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Usando pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) foram recolhidas amostras de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) e foram colocadas no sistema de diagnóstico descrito em 1C contendo uma concentração de substrato de 5,0 mM de N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida. A inspeção visual das amostras depois de 15 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para amarelo apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>
A	Sim	Amarelo	Sim
B	Sim	Amarelo	Sim
C	Sim	Amarelo	Sim
D	Não	Sem alteração de cor	Não
E	Não	Sem alteração de cor	Não
F	Não	Sem alteração de cor	Não



Exemplo 7: Teste à base de mieloperoxidase - sistema de líquido

*Preparação do sistema de diagnóstico*

Para esta ferramenta de diagnóstico podem ser usados dois substratos diferentes, nomeadamente TMB ou ABTS. Usou-se 3350 µl de tampão de succinato (pH 5,4) compreendendo sacarose 0,3 M e adicionou-se 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% e 7 µl dos substratos (5-40 mM de ABTS, 20-150 mM de TMB, 0,0128 mM de cristal violeta e 0,025 mM de Fast Blue RR modificado). O TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) é primeiro dissolvido em N,N-Metilformamida, o cristal violeta, o leuco cristal violeta e o Fast Blue RR modificado foram dissolvidos em etanol, enquanto o ABTS pode ser dissolvido em água. 100 µl das soluções foram introduzidos num tubo eppendorf por meio de pipeta.

*Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15 µL de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste, preferencialmente entre 4-6 µL e misturado por sacudidura manual durante 10 segundos. Esta mistura é incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor, de incolor para azul (TMB ou verde (ABTS)), respectivamente. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

O fluido de ferida de amostras infectadas e não infectadas é diluído 1:20. 5 µl destas diluições de amostras infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) são incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 1A contendo os dois substratos diferentes. A inspeção visual das amostras depois de 5 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para azul no caso do TMB apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>	<b>Actividade da MPO* U/mL</b>
A	Sim	Azul	Sim	190
B	Sim	Azul	Sim	160
C	Sim	Azul	Sim	175
D	Não	Sem alteração de cor	Não	5
E	Não	Sem alteração de cor	Não	12
F	Não	Sem alteração de cor	Não	17

\* medida com ensaio padrão à base de Guaiacol

*Exemplo 8: Teste à base de mieloperoxidase - sistema de gel**Preparação do sistema de diagnóstico*

Para esta ferramenta de diagnóstico podem ser usados dois substratos diferentes, nomeadamente TMB ou ABTS. Usou-se 3350 µl de tampão de succinato (pH 5,4) compreendendo sacarose 0,3 M e adicionou-se 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a

1% e 7 µl dos substratos (5-40 mM de ABTS, 20-150 mM de TMB, 0,0128 mM de cristal violeta, 0,1 mM de leuco cristal violeta ou 0,025 mM de Fast Blue RR modificado). O TMB (3,3'5,5'-Tetrametilbenzidina) é primeiro dissolvido em N,N-Metilformamida, enquanto o ABTS pode ser dissolvido em água. 100 µl desta solução foram apropriadamente misturados com igual volume de solução (1,5% p/v) de agarose aquecida (45°C) e transferidos para dentro de cavidades de uma placa de 96 cavidades.

#### *Diagnóstico*

Um volume entre 1 e 15 µL de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste, preferencialmente entre 4-6 µL. Esta mistura é incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor para azul e verde, respectivamente. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

#### *Protocolo de teste e resultados:*

5 µl de amostras infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubados com o sistema de diagnóstico descrito em 1B contendo os dois substratos para MPO. A inspeção visual das amostras depois de 5 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para azul ou verde apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

Exemplo 9: Teste à base de mieloperoxidase - sistema à base  
de cotonete

*Preparação do sistema de diagnóstico*

Usou-se 3350 µl de tampão de succinato (pH 5,4) compreendendo sacarose 0,3 M e adicionou-se 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% e 7 µl dos substratos (20 mM de ABTS, 100 mM de TMB, 0,0128 mM de cristal violeta, 0,1 mM de leuco cristal violeta e 0,025 mM de Fast Blue RR modificado). 40 µl desta solução foram introduzidos em placas de microtitulação por meio de pipeta.

*Diagnóstico*

Pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) mergulhados no fluido da ferida diluído a 1:20 e absorvendo, assim, entre 1 e 12 µL de fluido de ferida, preferencialmente entre 5 e 8 µL. O sistema de teste é então colocado em placas de microtitulação contendo a solução de substrato e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma alteração de cor no cotonete (ou seja, no tecido de poliéster) para azul ou verde, respectivamente. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Usando pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) foram recolhidas amostras de ferida infectada (A, B, C) e não infectada (D, E, F), diluídas a 1:20, e foram colocadas no sistema de diagnóstico descrito em 1B contendo os substratos TMB. A inspeção visual das amostras depois de 5 minutos de incubação indicava uma alteração de cor para azul apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>
A	Sim	Azul	Sim
B	Sim	Azul	Sim
C	Sim	Azul	Sim
D	Não	Sem alteração de cor	Não
E	Não	Sem alteração de cor	Não
F	Não	Sem alteração de cor	Não

*Exemplo 10: Teste à base de lisozima - sistema de líquido**Preparação do sistema de diagnóstico*

Uma quantidade entre 1 e 15 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* é suspensa em 15 ml de tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,0). Preferencialmente é suspensa uma quantidade entre 8 e 10 mg. 290  $\mu\text{L}$  desta solução é introduzida num tubo eppendorf transparente por meio de pipeta.

*Diagnóstico*

Um volume de 10 µL de fluido de ferida é adicionado ao sistema de teste e misturado por sacudidura manual durante 10 segundos. Esta mistura é incubada a 37°C durante 15 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por uma diminuição da turvação. As misturas contendo amostras de feridas não infectadas não mudam de cor.

*Protocolo de teste e resultados:*

Amostras de 10 µL de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 2A contendo *Micrococcus lysodeikticus* como um substrato para lisozima. A inspecção visual das amostras depois de 15 minutos de incubação a 37°C indicava uma alteração da turvação apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

<b>Amostra de ferida</b>	<b>Infecção de acordo com o diagnóstico de médicos</b>	<b>Resposta de teste</b>	<b>Infecção de acordo com o teste</b>	<b>Actividade da lisozima* U/mL</b>
A	Sim	Transparente	Sim	1200
B	Sim	Transparente	Sim	974
C	Sim	Transparente	Sim	1800
D	Não	Turva	Não	210
E	Não	Turva	Não	205
F	Não	Turva	Não	320

\* medida com peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* como substrato

Exemplo 11: Teste à base de lisozima - sistema à base de gel

*Preparação do sistema de diagnóstico*

15 a 50 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* são suspensos em 10 g de agarose (1% p/v) que é dissolvida em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,0, e aquecida no micro-ondas. A solução é apropriadamente misturada e transferida para as cavidades de uma placa de 96 cavidades. Num segundo ensaio, o peptidoglicano (*Micrococcus lysodeikticus*) é manchado com Remazol Brilliant Blue (RBB). Seguidamente, 50 mg de peptidoglicano são suspensos em 0,5 ml de solução de Remazol Brilliant Blue (0,5% p/v) e diluídos com igual volume de solução corante (2,5% p/v de NaSO<sub>4</sub>). É usado o seguinte gradiente térmico: 25°C durante 10 minutos, 65°C durante 5 minutos. Depois da centrifugação durante 4 minutos a 13000 rpm, são efectuados vários passos de lavagem até o sobrenadante ficar incolor. Num terceiro ensaio são usadas duas camadas de peptidoglicano manchado e não manchado, enquanto o peptidoglicano manchado é aplicado como atrás descrito (sistema de dupla camada). Adicionalmente, utilizou-se uma matriz compreendendo 80% de agarose a 1% e 20% de gelatina a 2%, elastina, fibronectina e colagénio, respectivamente.

*Diagnóstico*

Um volume de 100 µL de fluido de ferida é

adicionado ao sistema de teste. Esta mistura é incubada a 37°C durante 15 e 60 minutos. A digestão do peptidoglicano devido à actividade da lisozima resulta num aumento da transparência que pode ser medida a 450 nm e que pode claramente ser vista no caso de feridas infectadas. No caso do peptidoglicano tingido, o corante é libertado no sobrenadante, que passa a azul no caso de feridas infectadas. No caso do sistema de dupla camada, o sistema muda de cor, de amarelo para azul, o que pode ser facilmente visto depois da incubação durante pelo menos 30 minutos.

*Protocolo de teste e resultados:*

Amostras de 100 µL de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) foram incubadas com o sistema de diagnóstico descrito em 2B contendo peptidoglicano como um substrato para lisozima. A inspecção visual das amostras depois de 15 e 60 minutos de incubação indicava uma alteração da transparência apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

Amostra de ferida	Infecção de acordo com diagnóstico de médicos	Resposta de teste Sistema não manchado	Resposta de teste Sistema manchado	Resposta de teste Sistema de camada dupla	Infecção de acordo com o teste
A	Sim	Transparente	Azul	Azul	Sim
B	Sim	Transparente	Azul	Azul	Sim
C	Sim	Transparente	Azul	Azul	Sim
D	Não	Turva	Transparente	Amarelo/branco	Não
E	Não	Turva	Transparente	Amarelo/branco	Não
F	Não	Turva	Transparente	Amarelo/branco	Não



Exemplo 12: Teste à base de lisozima - sistema à base de  
cotonete

*Preparação do sistema de diagnóstico*

15 a 50 mg de peptidoglicano de *Micrococcus lysodeikticus* tingido com Remazol Brilliant Blue (RBB) são suspensos em 10 g de agarose (1% p/v) dissolvida em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,0, e aquecida no micro-ondas. A solução é apropriadamente misturada e transferida para cavidades de uma placa de 96 cavidades.

*Diagnóstico*

Pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) são mergulhados em fluido de ferida absorvendo, assim, entre 1 e 12 µL de fluido de ferida, preferencialmente entre 5 e 8 µL. O cotonete é então lavado numa solução tampão e esta solução é então colocada nas placas de microtitulação contendo o sistema à base de gel com peptidoglicano tingido. O sistema é então incubado a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, a infecção da ferida será indicada por um sobrenadante azul/os materiais ficam azuis no caso de feridas infectadas.

*Protocolo de teste e resultados:*

Usando pequenos cotonetes (0,5x0,5 cm) de uma

Microfibra PES de poliéster (Microjet S1000) foram recolhidas amostras de feridas infectadas (A, B, C) e não infectadas (D, E, F) e foram colocadas no sistema de diagnóstico atrás descrito contendo o sistema à base de gel com peptidoglicano tingido com remazol. A inspeção visual do sobrenadante/dos materiais depois de 30 minutos de incubação indicava o desenvolvimento de uma cor azul apenas para as amostras A, B e C de ferida infectada.

### Exemplo 13

#### Combinação de enzimas - sistema de líquido

##### *Preparação do sistema de diagnóstico*

100 µL dos substratos líquidos descritos para as enzimas elastase, mieloperoxidase e Catepsina G (ver exemplos 1 a 10) foram preparados e transferidos para uma placa de microtitulação.

##### *Diagnóstico*

São adicionados 5 µl de fluidos de ferida, de feridas infectadas (A-F) e de feridas não infectadas (G-L). O fluido de ferida pode ser recolhido com um capilar ou uma seringa e é depois dividido em alíquotas. Alternativamente, usaram-se cotonetes para transferir amostras de feridas infectadas (A-F) e de feridas não infectadas (G-L) para 1-2 ml de solução tampão. Adicionaram-se alíquotas de 250 µl (500 µl) à placa de microtitulação com os quatro substratos de diferentes enzimas.

As placas são incubadas a 37°C. Passados 10 minutos, o ensaio para elastase foi inspecionado e passou a amarelo no caso de feridas infectadas. Passados 30 minutos, o ensaio de Catepsina G e de lisozima foram inspecionados e indicavam infecção pela passagem a amarelo, azul e transparente, respectivamente. Passados 5 minutos, dois ensaios para MPO (TMB e ABTS) foram inspecionados e indicavam infecção pela passagem a azul e verde, respectivamente. Passados 60 minutos, o ensaio para MPO usando cristal violeta, leuco cristal violeta e Fast Blue RR modificado foram inspecionados e indicavam infecção por alteração da cor.

A amostra A mostra um desenvolvimento de cor menos pronunciado no ensaio de Elastase mas era claramente positiva nos outros ensaios. Pelo contrário, as amostras D e E mostram um desenvolvimento de cor menos pronunciado no ensaio de ABTS MPO enquanto eram positivos nos outros ensaios. Isto confirma a importância da combinação de pelo menos 2, preferivelmente 3, o mais preferivelmente 4, ensaios diferentes para a ferramenta de diagnóstico.

Lisboa, 12 de dezembro de 2016

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar a infecção numa ferida que compreende os passos de:

- colocar uma amostra obtida a partir de uma ferida em contacto com pelo menos três substratos para pelo menos três enzimas seleccionadas a partir de uma das seguintes combinações:

Lisozima, elastase e catepsina G, ou

Lisozima, elastase e mieloperoxidase, ou

Lisozima, catepsina G e mieloperoxidase, e

- detectar uma infecção numa ferida quando é determinada uma conversão dos pelo menos três substratos com as referidas pelo menos três enzimas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a amostra ser colocada em contacto com pelo menos quatro dos referidos substratos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado por** a amostra ser fluido de ferida, um penso de ferida compreendendo fluido de ferida ou um cotonete compreendendo fluido de ferida.

4. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** o referido substrato estar disperso numa matriz de um polímero medicinalmente aceitável, preferivelmente um hidrogel.

5. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** os referidos substratos estarem ligados a uma fibra, em particular a uma fibra de um penso de ferida ou de um cotonete.

6. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** o substrato para lisozima ser seleccionado a partir do grupo consistindo num peptidoglicano, preferivelmente um peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* tingido com um corante de vinilsulfona.

7. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** o substrato para elastase ser seleccionado a partir do grupo consistindo em N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida e Cisteamida-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-pNA.

8. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** o substrato para catepsina G ser seleccionado a partir do grupo consistindo em N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida e Cisteamida-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

9. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, **caracterizado por** o substrato para mieloperoxidase ser seleccionado a partir do grupo consistindo em 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico e Fast Blue RR modificado com isocianato.

10. Penso para ferida ou cotonete compreendendo pelo menos três substratos para pelo menos três enzimas seleccionadas a partir de uma das seguintes combinações:

Lisozima, elastase e catepsina G, ou

Lisozima, elastase e mieloperoxidase, ou

Lisozima, catepsina G e mieloperoxidase,

sendo os referidos substratos capazes de libertar um agente corante ou provocar o desembaciamento.

11. Penso ou cotonete para ferida de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** o penso ou cotonete compreender pelo menos quatro dos referidos substratos.

12. Penso ou cotonete para ferida, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **caracterizado por** os referidos substratos estarem dispersos ou covalentemente ligados numa matriz de um polímero medicinalmente aceitável ou ligado a uma fibra.

13. Penso para ferida de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **caracterizado por** os referidos substratos serem seleccionados a partir do grupo consistindo num peptidoglicano, preferivelmente um peptidoglicano de *Micrococcus lysodeictikus* tingido com um corante de vinil-sulfona, N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida, N-metoxissuccinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etil-benzotiazolino-6-sulfónico), cristal violeta, leuco cristal violeta, ácido sináptico e Fast Blue RR modificado com isocianato.

Lisboa, 12 de dezembro de 2016

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- WO 0230478 A