

(11) Número de Publicação: **PT 1600775 E**

(51) Classificação Internacional:  
**G01N 33/579** (2007.10) **G01N 33/92** (2007.10)  
**G01N 33/53** (2007.10)

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

|                                                                    |                                                                                                                   |           |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| (22) Data de pedido: <b>2005.04.28</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>THOMAS STIEF, DR.</b>                                                                     |           |
| (30) Prioridade(s): <b>2004.05.26 DE</b><br><b>102004025780</b>    | <b>LIMESSTRASSE 15 35415 POHLHEIM</b>                                                                             | <b>DE</b> |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2005.11.30</b>               | (72) Inventor(es):<br><b>THOMAS STIEF, DR.</b>                                                                    | <b>DE</b> |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2008.10.01</b><br><b>248/2008</b> | (74) Mandatário:<br><b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b><br><b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> | <b>PT</b> |

(54) Epígrafe: **PROCEDIMENTO PARA DETERMINAR O REACTIVIDADE DE LIPOPOLISACÁRIDE E/OU DE LIPÍDIO-A E/OU DE GLUCANO, SENDO TAL DETERMINAÇÃO INDEPENDENTE DE FACTORES ANTI-LIMULUS**

(57) Resumo:

## Resumo

**"Procedimento para determinar a reactividade de lipopolisacáride e/ou de lipídio-A e/ou de glucano, sendo tal determinação independente de factores anti-limulus"**

Descrito é um procedimento que é independente dos factores que inibem factores de Limulus para medir a reactividade dos lipopolissacáride (LPS) e/ou de lipídio-A e/ou de glucano em líquidos biológicos com o auxílio de uma modificação do teste de Limulus .

A independência dos factores que são anti-Limulus é obtida por uma oxidação forte da amostra.

## Descrição

**"Procedimento para determinar o reactividade de lipopolisacáride e/ou de lipídio-A e/ou de glucano, sendo tal determinação independente de factores anti-limulus"**

A presente invenção diz respeito a um melhoria de teste para determinar reatividades de lipopolisacaride e / ou de lipídio-A e / ou de glucano em fluidos do corpo.

Reatividade como é entendida no contexto do presente descrição é actividade de lipopolisacaride e / ou de lipídio-A e / ou de glucano, particularmente de beta-1,3-D-glucano, num líquidos biológicos como por exemplo plasma. lipopolisacaride e / ou lipídio-A e / ou glucano reativo é lipopolisacaride e / ou lipídio-A e / ou glucano que é activo e / ou livre no sentido patofisiológico e / ou farmacológico e / ou toxicológico.

Infecções com bactérias gram-negativas (como Escherichia coli) ou com fungos (como Candida albicans) representam um grande problema médico desde muito tempo. Os germes podem invadir o córrego do sangue, ou espaço de meninges onde podem causar fatais condições, como sepsis ou meningite. Por conseguinte, estes agentes patogénicos que são clinicamente tão importante devem ser diagnosticados o mais cedo possível.

No entanto, procedimentos microbiológicos para crescer estes germes são muito lentos. Em muitos casos, o diagnóstico só pode ser feito depois de dias ou semanas. No entanto, em algumas horas o estado clínico do paciente pode piorar de tal forma, que, no pior caso, o paciente morre devido a esta infecção.

Portanto, ela tem sido muitas vezes tentou encurtar o intervalo temporário para fazer um diagnóstico. Uma das teses abordagens é a detecção de lipopolisacarídes (a seguir denominado "LPS"), de lipídio-A, ou de glucanos com o chamado ensaio de Limulus. LPS, lipídio-A, e glucanos são perigosos para o doente, pois no sangue podem causar uma coagulação intravascular disseminada patológica (DIC).

Paredes das células das bactérias gram-negativas são parcialmente constituídas por LPS (no passado chamado endotoxina), que é composta de polissacarídeo que é a parte inofensiva e de a parte de lipídio-A que que é perigosa para muitas células.

A reactividade LPS e/ou de lipídio-A e/ou de glucano é de grande importância fisiopatológica: LPS activa e/ou LPS livre e / ou lipídio-A activo e / ou lipídio-A livre e / ou glucano activo e / ou glucano livre está reagindo por exemplo muito intensamente com os monócitos de sangue ou com o endotélio. Em seguida, os monócitos podem ser ativados com veemência ou eles podem ser destruídos, e compartimentos internos da célula está em contato com o plasma e trombócitos.

Como monócitos contêm DNA e tecidos-factor, a coagulação é ativada imediatamente em sepsis. Coagulação intravascular disseminada ameaça a vida porque, por exemplo, tromboses múltiplas em pequenas embarcações de sangue podem provocar a falência de muitos órgãos.

A presente invenção descreve um procedimento, que imita a interação fisiopatológica, ou seja, a capacidade de reacção, de LPS, de lipídio-A, de glucano, respectivamente, com células sensíveis, em que as células e / ou membranas das células in vitro são substituídas pelos factores de Limulus.

Portanto, um tal procedimento que detecta com sensibilidade e especificamente dentro de poucos minutos LPS, lipídio-A ou glucanos, especialmente LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano, reactivo e / ou livre é de grande importância clínica.

De acordo com o estado da técnica LPS é detectado com o teste do Limulus [Hurley JC Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. Clinical Microbiology Reviews 1995, 8: 268-292]. O princípio deste teste é que LPS - mas também glucanos - estão ativando o sistema de coagulogen / coagulin do Horseshoe-caranguejo (*Limulus polyphemus*); este sistema é chamado o sistema de Limulus.

O sistema de limulus consiste principalmente dos seguintes factores: factor C, factor B, factor A, e coagulogen. LPS ou lipídio-A ativa factor C, factor C activado ativa factor B, factor B activado é ativando factor A. Factor A activado converte coagulogen que é solúvel em coagulin que é insolúvel.

No sistema de Limulus para glucanos, que são componentes de fungos, há também um fator G, que é activado por glucanos, especialmente por beta-1,3-D-glucanos, a uma serina-protease, o que gera factor A activado.

O sistema de Limulus é um sistema de defesa do *Limulus polyphemus* contra germes patológicos e é um primitivo sistema de imunidade nativa.

No ensaio de Limulus LPS e/ou lipídio-A e / ou glucanos da amostra é agindo sobre os factores de amebocytes de Limulus, nos seguintes chamados factores de Limulus, e se traduz em mudanças, que podem ser detectadas em diferentes formas (Hurley JC, Clinical Microbiology Reviews 1995, 8: 268-292, Ochiai et al., Microbiol. Immunol. 2002; 46: 527-533).

Estes Limulus-factores são preparados de acordo com o estado da técnica, através do lisado de amebocytes de Limulus (E.U. 3.954.663), a partir desta resulta o acrónimo LAL.

Exemplos de procedimentos de detecção são o teste de gelificação da LAL, o teste da LAL que se baseia em coagulogen, bem como teste cromogénico da LAL.

No ensaio de LAL cromogénico (cromogénico teste de Limulus) a reacção da FactorA activado para coagulogen é imitado por substituição de coagulogen por um substrato cromogénico, por exemplo, S-2834 ® (Isoleucyl-Glutamyl-Glycyl-Arginyl-paranitro-Anilide = ILe-Glu-Gly-Arg-pNA) ou S-2423 ® (CH<sub>3</sub>-CO-ILe-Glu-Gly-Arg-pNA) (Chromogenix, Mölndal, Suécia).

O teste cromogénico de Limulus é comercialmente disponíveis, por exemplo, sob os nomes comerciais LimulusAmebocyteLysateEndochrome ® (Charles River Endosafe; Charleston, E.U.A.), Coatest ® PlasmaEndotoxin ou Coamatic ® Endotoxin (Chromogenix, Mölndal, Suécia) ou Pyrochrome ® (CapeCode, Falmouth, E.U.A.).

O teste cromogénico de Limulus pode ser realizado em cinéticos hiperbólicos com uma medição em um ponto final (a 37°C, o tempo de incubação de plasma = 41 min; informações de produto Pyrochrome ®, Haemochrom, Essen, Alemanha), ou seja, substrato cromogénico e os factores de Limulus C, B, A são acrescentados juntamente com a amostra a ser testada para endotoxina. Consequentemente, a ativação dos fatores C, B, A, que é a clivagem do substrato acontece ao mesmo tempo. Quanto maior o tempo de incubação do ensaio é previamente à adição do reagente de paragem, o mais factorA ativado é gerado e os mais substrato cromogénico é atacado.

Alternativamente, o substrato cromogénico pode ser

adicionado após um intervalo de tempo após a adição dos fatores C, B, A. A desvantagem desta situação é que, durante a ação da endotoxina sobre os fatores C, B, A mais interações autocatalíticas e / ou autodestrutivas estão acontecendo (veja a figura 21). O substrato cromogênico (como adicionado no ensaio de taxa hiperbólica) inibe parcialmente essas interações.

O principal problema com o teste do Limulus é, que as elementos anti-Limulus da amostra, como por exemplo proteínas, especialmente inibidores de proteases-serina, como antitrombina III e / ou heparina-cofactor II e / ou alpha2-antiplasmin, estão perturbando a ativação do sistema de Limulus. Isso significa que o resultado do teste do Limulus depende, entre outras coisas sobre o conteúdo das fatores anti-Limulus na amostra, como por exemplo: proteínas, especialmente inibidores de proteases-serina como antitrombina III e / ou heparina-cofactor II e / ou alpha2-antiplasmin (ver figuras 12,14). Esta interferência é eliminado de acordo com o estado da técnica por 10x diluição da amostra e pelo tratamento pelo calor da amostra diluída antes do ensaio de Limulus, por exemplo, para 15-20 min a 75°C. Alternativamente, a amostra pode também ser acidificada para desactivar o factores anti-Limulus (ver Obayashi, T. et al. Clin Chim Acta 149, 55-65, 1985; J. Lab. Clin. Med. 4, 321-330, 1984 ; E.U. 4495294, Tsuji et al., Prog. Clin. Biol. Res., 231, 443-457, 1987). No entanto, este procedimento é problemático, porque LPS e/ou lipídio-A e/ou glucano, que tinha sido ligado aos inibidores fisiológicos e é, portanto, inativos podem ser liberados das vinculativo, ou seja, o método não é principalmente um teste para LPS ou lipídio-A ou glucano reactivo e/ou ativo e / ou livre, mas é sobretudo um teste para LPS ou lipídio-A ou glucano vinculato; portanto, este método não é adequado para a rotina clínica. LPS, lipídis-A, ou glucano vinculato tem

subordinados importância fisiopatológica. Além disso, LPS ou lipídio-A activo ou livre da amostra são quase completamente inativado por tratamento térmico. Os testes comerciais disponíveis de *Limulus* não têm encontrado entrada na rotina clínica entre outras coisas, devido a esses problemas.

Por exemplo, existem anticorpos plasmáticos e outras proteínas que ligam endotoxinas, como o lipopolisacarídeo-vinculativo-proteína (LBP), que neutralizam LPS e/ou lipídio-A e/ou glucanos. No entanto, estes LPS e / ou lipídio-A e / ou glucanos vinculados e assim neutralizados são de subordinada importância clínica. Patofisiologicamente importante é LPS, lipídio-A ou glucano (como por exemplo, a substância de *Candida zymosan A*), que não é neutralizado e / ou livre, que pode reagir, por exemplo com os monócitos do sangue; este é o chamado LPS ou lipídio-A ou glucano reativo, respectivamente.

Uma versão deste LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano neutralizado por exemplo, por tratamento termico irá falsificar o resultado do teste, e permitiria que apenas um reduzido conclusão sobre a concentração da LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano que não é neutralizado.

Além disso, um procedimento é conhecido para a determinação da actividade das proteases do *Limulus* que são ativados por endotoxina (DE 195 49117).

Baseando sobre este estado da técnica a tarefa de apresentar a invenção foi encontrar um procedimento simples e um sistema de teste correspondente adequado que permite determinar rapidamente o conteúdo de LPS e/ou lipídio-A e / ou glucano activo e / ou ativo e/ou da mostra, ou seja, a reactividade de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano.

Uma outra tarefa do presente invenção foi encontrar um procedimento adequado e um sistema de teste que permite diferenciar LPS ou lipídio-A activo, respectivamente, de glucano activo da uma amostra.

Uma outra tarefa do presente invenção foi encontrar um procedimento adequado e um sistema de teste que permite determinar LPS e / ou lipídios-A e / ou glucano ativo e / ou livre de uma amostra e que é insensível aos LPS e/ou lipídi-A e/ou glucano neutralizado.

Uma outra tarefa de apresentar a invenção foi encontrar um procedimento e um adequado sistema de teste de funcionamento com uma cinética linear e / ou que seja adequado para rotina.

Uma outra tarefa de apresentar a invenção foi encontrar um adequado sistema de teste que permite omitir a diluição antes e / ou tratamento térmico da amostra para determinar LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano.

Surpreendentemente verificou-se que por adição de um oxidante adequado, se for o caso, juntamente com um detergente, como por exemplo: Triton-X100 ®, de preferência numa concentração final de até 0,1%, e / ou de um mediador de solução, como por exemplo: polietileno-glicol, de preferência numa concentração final de até 10%, a interferência da matriz da amostra (= em torno do analito) os factores perturbadores sobre o sistema de Limulus poderia ser eliminados.

Embora se saiba da EP-A-297,597, que por tratamento oxidativo de líquidos biológicos da actividade da serina-proteases ou inibidores da serina-proteases podem ser determinados, no entanto este documento não refere uso de oxidantes no ensaio de Limulus. Além disso, de acordo com a

presente invenção ele mostrou que para o uso com o sistema de Limulus substancialmente mais elevadas doses de oxidante são necessárias, e que são, por exemplo: 5-10x com a dose, necessárias para inactivar inibidores da proteases de serina que são sensíveis ao oxidantes.

A presente invenção diz respeito a um processo para determinar o conteúdo de lipopolisacaride e/ou lipídio-A e/ou glucano ativo e/ou livre em líquidos biológicos a um pH entre 6 e 10 segundo reivindicação 1 compreendendo.

- A) tratamento da amostra com pelo menos um oxidante do grupo de geradores de oxigênio singlete,
- B) adição de, pelo menos, um factor de amebocytes de Limulus à amostra que foi oxidada e,
- C) determinação da ativação de, pelo menos, um dos factores da amebocytes de Limulus.

Oxidantes, de acordo com a invenção pode ser de natureza arbitrária, até agora eles oxidar elementos anti-Limulus da amostra, especialmente antitrombina III e / ou heparina-cofactor II e / ou alpha2-antiplasmina.

Exemplos de oxidantes são geradores de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), como cloraminas ou sais de HOCl, particularmente chloramine-T ® (N-cloro-toluol-sulfamida) ou chloramine-B ® (N-cloro-benzol-sulfonamida).

O acordo com a invenção oxidantes utilizados são adicionados em doses relativamente elevadas para desactivar o factores anti-Limulus, no entanto, sem alterar a reactividade de LPS e/ ou de glucano; particular, deve ser evitada para reativar ou a libertação de LPS e / ou glucano inativo e/ou vinculado e/ou ligado da amostra, e isso deve ser evitado

inactivar LPS ou lipídio-A e/ou glucano activo no procedimento do teste.

Doses de oxidante normalmente são 5-10x acima das doses necessárias para a inactivação oxidativa de oxidante-sensíveis inibidores de proteases de serina de plasma, por exemplo, antitrombina III ou  $\alpha$ 2-antiplasmina.

A concentração do oxidante, e.g. chloramine-T ®, com o reagente de oxidante é comumente 15-200 mmol/l, principalmente 30-120 mmol/l, especialmente preferido 50-70 mmol/l.

O oxidante é tipicamente acrescentado em um montante de 15-200  $\mu$ moles, particularmente 30-120  $\mu$ moles, especialmente preferido 50-70  $\mu$ moles por ml de fluido da amostra, particularmente plasma. O oxidante pode estar presente em NaCl fisiológica e/ou em um bufer, se necessário, em especial PBS (pH 7,4),  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8 - 9), ou citrato (pH 7 - 9, preferiu 7,4-8,4), especialmente preferido citrato de sódio uuma concentração de 10-200 mM, particularmente 20-100 mM, especialmente preferiu 50 mM, se a relação amostra: reagente oxidante é 1:1.

Doses mais baixas geralmente não eliminam a influência da matriz de plasma que perturba o Limulus-sistema; doses mais elevadas comumente resultam num aumento da inactivação de LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano no plasma.

Além disso, tem de ser considerado que quando se realiza o procedimento, de acordo com a invenção, após realizar a oxidação reacção lá não permanecem grandes quantidades de oxidante na amostra: os factores Limulus-C, B, A são resistentes apenas até uma adição de cerca de 5  $\mu$ moles chloramine-T ® por ml amostra de plasma (em contraste com os típicos serina-proteases de mamíferos, como por exemplo, tripsina ou plasmina, que são, pelo menos, 10x mais

resistentes, porque, de acordo com EP-A-297,597 antioxidante lá não é adicionado). Portanto após executar a oxidação o montante remanescente do oxidante deve ser inativado se for o caso, por exemplo, por um inibidor da oxigênio singlete.

Assim, quando usando p. e. 60 mM de chloramine-T ® o montante remanescente do oxidante após a oxidação é neutralizado por um inibidor da oxigênio singulet, por exemplo, ascorbato ou com preferência metionina, antes de os factores de Limulus são adicionados à reação ou o inibidor de oxigênio singulet e factores de Limulus são adicionados ao mesmo tempo.

Preferíveis quantidades de oxidante, particularmente chloramine, de acordo com a etapa a) na amostra estão na faixa entre 20 a 100  $\mu$ moles por ml amostra de plasma.

O acordo com a etapa b) factores utilizados de amebocites de Limulus podem ser reagentes conhecidos, que são produzidos por lisis de amebocites de Limulus (os chamados LAL), porém eles também poderiam ser produzidas gene-tecnicamente. Preferencialmente usado aqui é o Pyrochrome ®-reagente, que, em comparação com Coamatic®-reagente é mais sensível para LPS. Referências sobre LAL dentro desta descrição tem de ser entendidas de tal forma que também factores de amebocites de Limulus podem ser utilizados, que tenham sido produzidos por outro caminho.

Na etapa b) um ou todos os factores de amebocites de Limulus podem ser utilizados. Preferido é o uso de uma combinação de factores A, B, e C.

A activação de, pelo menos, um dos factores de Limulus amebocites (LA) pode ser determinada em uma forma conhecida como, por exemplo, através da medição do tempo de gelificação, medindo a quantidade de coágulos gerados por LA ou factores de

preferência através da medição da cromofore cromogênico que é liberado pela LA-fatores fora de um composto que é atacado por LA-fatores activados.

As amostras devem ser utilizadas de acordo com a invenção pode ser arbitrário biológico líquidos que possam conter lipopolisacaride e / ou lipídio-A e / ou glucanos. Exemplos disso são sangue, produtos derivados do sangue, licor, urina, saliva, lavado bronquioalveolar, ascite, derrames pericárdicos ou pleurais, leite, líquidos de tecidos, líquido linfático e particularmente plasma. Outras amostras a serem utilizados são produtos, preferencialmente industriais contendo anti-Limulus factores como, por exemplo, terapêutica plasmática de proteínas, como albumina ou antitrombina III. Além disso, verificou-se que líquidos biológicos que contenham heparina podem influenciar os resultados do teste, apesar tratamento oxidativo, p. e. por oxidação, com 1 parte de 60 mM chloramine-T ® por 1 parte de plasma só há então independência de matriz se a amostra contém menos de 1 UI / ml heparina.

Porque o plasma de pacientes normalmente mesmo sob terapêutica heparinização, contém valor inferior a 0,5 UI / ml heparina, quase todos os plasmas de pacientes podem ser analisados para LPS e/ou lipídio-A e/ou glucano reactivo.

Amostras com mais de 1 UI / ml de heparina, por exemplo, à medida que ocorrem em pacientes sob hemodiálise ou cirurgia cardíaca extrapulmonar com um máximo de cerca de 10 UI / ml de heparina, devem ser oxidados com doses elevadas de oxidantes, por exemplo, com 100 µmoles chloramine-T ® por ml amostra de plasma, para obter total independência da matriz ou a heparina deve ser neutralizado pela adição de um inibidor de tais como Polybrene ®.

De preferência o teste usa comparativamente baixas

concentrações de oxidantes, a fim de imitar a melhor interação fisiopatológicos de LPS ou lipídio-A ou glucano, respectivamente, com razoável células humanas (= reatividade de LPS ou reatividade de lipídio-A, ou reatividade de glucano, respectivamente): a concentração de cerca de 60 mmol / l chloramine-T ® é mais fisiológica do que um de 120 mmol / l no reagente de oxidante (concentrações de chloramine de cerca de 10 mmol / l podem ser encontrados no microambiente de granulócitos neutrófilos ativados ). Devido a isso, de preferência as concentrações de oxidantes, de preferência chloramine-T, é igual ou inferior a 100 mmol / l, especialmente inferior ou igual a 60 mmol / l (se a relação entre amostra de plasma e de reagente oxidante é 1 : 1), de preferência em amostras com menos de 1 UI / ml heparina.

Se necessário, um inibidor de heparina, p.e. Polybrene ® (hexadimethrine brometo) pode ser adicionado à amostra. No entanto, Polybrene ® estimula o LPS / sistema de Limulus, que não é no sentido de uma imitação da reatividade de LPS / monócitos. No entanto, de acordo com o estado da arte de preferência heparina amostras do paciente (normalmente de cerca de 30-60 UI / ml heparina no plasma, por exemplo, Endo Tube ET, Chromogenix, Mölndal, Suécia), são utilizados para o teste do Limulus.

As amostras devem ser utilizadas de acordo com a presente invenção conter menos de 1 UI / ml de heparina, e contêm um agente que está complexantes de cálcio tais como citrato ou EDTA, qual citrato é preferível que é como agente complexante de cálcio. Se tal for necessário um inibidor de glucano e / ou e inativador de glucano (como por exemplo Zwittergent ®, especialmente Zwittergent ® 3-14 (3 - (N, N-dimethylmyristylammonio) propano sulfonate) e / ou beta-1,3-D-glucanase (Helix pomatia ou Rhizoctonia solani) pode ser adicionado ao ensaio de aumentar a especificidade de LPS ou

lipídio-A.

O alegado processo de detecção pode operar com métodos usuais, como por exemplo: o cinética hiperbólica. Um outro objectivo da presente invenção é um processo que converte a complicada cinética hiperbólica do teste do Limulus em uma cinética linear, facilitando enormemente a avaliação.

Verificou-se que através da adição de pelo menos um guanidine-composto, como a arginina ou guanidine carbonato, e / ou de um agente caotropic, por exemplo, um cátion de um alcali-metal, como  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Cs^+$  ou um cátion de terra-alcali-metal, como  $Ca^{++}$  ou  $Mg^{++}$  antes ou durante a execução do passo c), ou em conjunto com os factores de Limulus uma cinética linear do ensaio é obtida.

Especialmente a eliminação da interferência de matriz, mas também a linearização do teste do Limulus e da diferenciação entre reatividade de LPS ou lipídio-A, por um lado, e glucanos, por outro lado, permitir, pela primeira vez determinações, que são adaptadas a rotina, de LPS e / ou lipídio-A e/ou glucano, especialmente da LPS e/ou lipídio-A e/ou glucano livre, no líquidos de corpo dos pacientes, que no seu sangue ou em produtos sanguíneos.

Portanto, em um novo arranjo do processo, de acordo com a invenção a reactividade de LPS ou lipídio-A pode ser diferenciada da reatividade de glucanos, de modo que a reatividade de ambos os grupos de toxinas pode ser determinada. Para esse efeito, o procedimento descrito acima é realizada na presença e na ausência de um inibidor de LPS ou de um inibidor de lipídio-A, respectivamente. Estes são subtraídos uns dos outros e por isso a reactividade que é especificamente causada por LPS e / ou lipídio-A é determinado.

Como inibidor de LPS ou como inibidor de lipídio-A, respectivamente, por exemplo, Polimixina-B (1 mg = 7868 UI, Aerosporin, Euro OTC Pharma, Kamen, na Alemanha, ou a partir de Sigma-Fluka, Deisenhofen, Alemanha) podem ser usados.

Para determinar a reatividade de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano da amostra, a amostra é primeiramente oxidada por um oxidante, como um chloramine, e a reação é preferencialmente interrompida por adição de um antioxidante. Posteriormente, ou, ao mesmo tempo, com a adição do antioxidante, o teste do Limulus é realizado na forma conhecida e as amostras são medidas tanto em falta (abordagem A) e na presença de um inibidor de endotoxina (abordagem B). Abordagem A a partir da reatividade LPS + lipídio-A + glucano da amostra pode ser determinada, que só reflecte abordagem B a reactividade de glucano. A diferença da medida reactiva, p.e. determinada como a diferença da absorção A - B do cromóforos liberados, estão resultando no conteúdo da reatividade de LPS e de lipídio-A em amostras que contenham glucano ou que estão livres de glucanos.

Absorção dessas medições e absorções que foram corrigidas para a própria actividade da PMB para abordagem B ( $B_{corr}$ ) podem ser convertidos em reatividades de glucanos, por exemplo, em reatividade, que é similar ao da zymosan A em  $\mu\text{g/ml}$ .

A diferença de absorção A -  $B_{corr}$  pode ser convertida em reatividades de LPS e / ou de lipídio-A, por exemplo, reatividade em que é semelhante ao de LPS em  $\text{ng / ml}$ .

A curva de calibração do teste é linear sob uso das medidas descritas até cerca de 10000  $\text{ng / ml}$  LPS no plasma normal, especialmente entre 200-300  $\text{ng / ml}$  LPS, ou até cerca de 100

$\mu\text{g/ml}$  zymosan A no plasma normal, especialmente entre 2000-3000 ng / ml = 2-3  $\mu\text{g/ml}$  zymosan A. Estas são reatividades referindo-se a um plasma normal, que foi complementado com estes montantes de LPS ou lipídio-A, respectivamente, ou de glucano.

Com o cinética hiperbólica reatividades plasmáticas de LPS cerca de 1 ng / ml (ou seja, 0,1 a 5 ng / ml), são detectáveis após cerca de 60-120 minutos à temperatura ambiente (RT, cerca de 23 ° C) cerca de 10 ng / ml (ou seja, de 1 a 50 ng / ml) após cerca de 30-60 min RT, cerca de 100 ng / ml (ou seja, 10 a 500 ng / ml) após cerca de 15-30 min RT, cerca de 1000 ng / ml (ou seja, 100 a 5000 ng / ml) após cerca de 8-15 min RT, cerca de 10000 ng / ml (ou seja, 1000 a 50000 ng / ml) após cerca de 4-8 min RT, dependendo e.g. sobre a variação dos respectivos "lote-a-lote" de produção comercial dos factores de *Limulus*.

Com o reatividades plasmáticas de glucano comparáveis valores são resultantes, no entanto a reactividade em ng / ml deve ser multiplicada pelo factor 100.

Se a amostra contiver mais altos valores de LPS e / ou lipídio-A e / ou glucano reativo e, em seguida, a amostra pode ser diluída com 3-10%, particularmente 4-9%, especialmente 7% albumina, de preferência albumina humana, de preferência em fosfato tampão salina (PBS).

A reactividade de LPS ou de lipídio ou de glucano não mostram um efeito inibitório em altas doses, ou seja, a extrema concentração de LPS ou lipídio-A, por um lado, ou de glucano por outro lado, por exemplo, cerca de 10000 ng / ml ou 100  $\mu\text{g}$  / ml, respectivamente, não resultam em uma inibição da reação do *Limulus*.

A amostra aqui descrita no teste do Limulus deve ter preferencialmente uma concentração de proteínas que corresponde aproximadamente à de plasma humano, ou seja, 30 - 100 g / l, especialmente 60 - 90 g / l.

O procedimento, de acordo com a invenção, bem como a reação da oxidação como a reação do Limulus, são preferencialmente realizadas a temperaturas entre 0 ° C e 50 ° C, especialmente entre 15 ° C e 45 ° C. Além disso, o procedimento é realizado preferencialmente em condições fisiológicas, especialmente em um valor de pH entre 6 e 10, preferido entre 7,0 e 9,5, especialmente entre 7,5 e 9,0. Se necessário, um buffer pode ser adicionado ao líquidos biológicos ou à reagentes utilizados, respectivamente.

Além de um sistema de teste é descrito que é adequado para a determinação da reatividade de lipopolysaccharide e / ou de lipídio-A e / ou de glucano. Isso inclui, pelo menos, um oxidante e factores de amebocytes de Limulus para tratar da amostra.

Especialmente foi preferido um adequado sistema de teste com cinética linear para determinar a reatividade de lipopolisacaride e / ou de lipídio-A e / ou de glucano que inclui, para além da referida reagentes pelo menos um reagente que cria uma cinética linear.

Além disso, um sistema de teste é descrito que, para além dos acima mencionados reagentes contém, pelo menos, um inibidor de LPS e / ou de lipídio-A para diferenciar entre a reatividade do lipopolysaccharide e / ou de lipídio-A da amostra, por um lado, e da reatividade de glucano da amostra, por outro lado.

Agora é descrito um típico desempenho do teste, de acordo com a invenção para determinar a reatividade basal de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano. O ensaio é realizado de preferência em duas abordagens, no entanto, ambas as abordagens podem também ser realizados separadamente.

Abordagem A (está dando a reactividade basal do (LPS + lipídio-A + glucanos)) 1 parte amostra (por exemplo, 10  $\mu$ l) foi incubado com 1 parte 15 - 200 mmol / l, especialmente 30 - 120 mmol / l, muito especialmente 50-70 mmol / l chloramine-T (CT), em PBS ou por adição de 0,1 - 2  $\mu$ moles, especialmente 0,3-1,2  $\mu$ moles, particularmente 0,5-0,7  $\mu$ moles CT em 0,1 - 100 peças PBS durante 10 minutos a 37°C (ou 30 minutos à temperatura ambiente). Então 1-5 peças, preferiu 1 parte, 100-230 mmol / l metionina em H<sub>2</sub>O ou 1 - 11,5  $\mu$ moles metionina em H<sub>2</sub>O foram acrescentados. Após 0 - 5 min à temperatura ambiente 0,5 - 5, de preferência 2-3, peças reagente de Limulus com ou sem substrato cromogênico para Limulus foram adicionados (por exemplo, Pyrochrome®, que tinha sido reconstituído com a quantidade de tampão de tris (geralmente 3,2 ml 200 mmol / l tris, pH 8), que indica o fabricante para o ensaio de Limulus em cinética hiperbólica). Se necessário, o antioxidante e / ou o inibidor de LPS já podem estar presentes no material de reconstituição para os factores de Limulus liofilizados, ou podem ser juntamente com os factores de Limulus. Para aumentar a especificidade do substrato cromogênico para os factores de Limulus o reagente de antioxidante pode conter um inibidor de tripsina, particularmente aprotinina, de preferência numa concentração de 100-10000 KUI / ml, particularmente 200-2000 KUI / ml e / ou doses de aprotinina de 100-10000 KUI, particularmente 200-2000 KUI por ml de amostra pode ser acrescentada à reação.

A absorção foi imediatamente determinada (valor basal) e após 1 - 10 minutos (a temperatura ambiente). Um eventual aumento

linear de absorção ( $\Delta A$  de controle) foi determinado. Se a amostra continha tripsina ou uma atividade que era semelhante à tripsina, como na pancreatite (cerca de 10 - 100 ng/ml de tripsina/ml), o  $\Delta A$  / min linear que aparecem aqui teve de ser subtraído de todos os valores em que tinham sido determinados no cinética hiperbólica.

Em seguida, ou o aumento da absorvância ( $\Delta A$ ) foi determinado à temperatura ambiente em distâncias de 2-15 min (cinética hiperbólica), ou após 0,5 - 300 min, particularmente 5 - 100 minutos, particularmente 10 - 50 min, especialmente preferiu 15 - 30 min (RT) e / ou quando na standard de reatividade de 10 ou 100 ng / ml LPS ocorreu um  $\Delta A$  dos 3-30%, em particular cerca de 15% do  $\Delta A$  máximo obtido, 1-20 partes, de preferência 5-10 partes, especialmente 5 partes de reagente de linearização foram adicionados; este consistia de um composto de guanidina como a arginina e / ou de um agente caotropico como o catião de álcalis, como  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Cs^+$  ou cátions de terra de álcalis como o  $Ca^{++}$  ou  $Mg^{++}$  (concentração final de preferência 75-750 mmol / l; preferiu concentração no acrescentado reagente = 100-1000 mmol / l, se for o caso com 0,1 - 2 mmol / l de concentração final de substrato cromogênico) e  $\Delta A/t$  foi determinado. Substrato foi adicionado preferiu no caso o substrato não estava presente no reagente de Limulus.

A adição do reagente de linearização transformou a cinética hiperbólica em uma cinética linear.

Se tal for necessário até 50 mmol / l, particularmente até 30 mmol / l, arginina (reagente de especificidade) foi adicionado já na primeira fase de incubação da LAL, porque arginina aumentou a especificidade, no entanto, ele também diminuiu a velocidade de reacção.

Em vez de arginina, de acordo com a invenção também outra substância que contenha um grupo de guanidina podem ser escolhida tanto para o reagente de linearização e para o reagente de especificidade, como por ex. carbonato de guanidina; o valor de pH destes reagentes deverá ser entre 7 e 10, especialmente entre 7,5 e 9,5.

Abordagem B (dando reatividade basal de glucano).

As condições de incubação foram idênticos aos abordagem A com a mudança que também polimixina B foi utilizada: 0,01 - 100 mg / ml da amostra de plasma, preferiu 0,1 -10 mg / ml da amostra de plasma, em particular 0.2-5 mg / ml da amostra de plasma , especialmente preferido 1-3 mg polimixina B / ml (correspondente a 10-30µg polimixina B por 10 µl plasma; 1 mg = 7868 U).

15000 U / ml polimixina B ter neutralizado até 10000 ng / ml reatividade de LPS num pool de plasma normal no sistema de Limulus que é descrita aqui.

A determinação do valor deltaA para plasma normal (sem zymosan A), foi subtraído de todos os valores de deltaA. Este foi um deltaA, que foi induzido pelo adicionado de polimixina B, e que deve ser subtraído de todos os valores de B.

Se, após a correcção desta situação o doente tinha valores positivos de deltaA e, em seguida, esses foram os reatividades causadas por glucanos.

Se a amostra tinha menos de 50 ng / ml reatividade de LPS, então abordagem B poderia ser realizada com 10 vezes menos além de polimixina B, ou seja, especialmente preferido 0,1-0,3

mg / ml da amostra de plasma. Isso resultou em uma melhor sensibilidade do ensaio.

O valor que havia sido determinado e corrigido na abordagem B, (valor basal de reatividade no plasma normal), têm de ser subtraído dos da abordagem A. Assim, a reactividade do LPS no material investigado foi determinada:

$$[\text{LPS} + \text{Lipidio-A} + \text{Glucanos}] - [\text{Glucanos}] = [\text{LPS} + \text{Lipidio-A}].$$

Abordagem C (dando atividade que é como tripsina).

Como abordagem A, reagente de linearização foi adicionado antes (ou eventualmente até 3 min depois), o reagente de Limulus; uma nova incubação após a adição do reagente de Limulus não era necessária.

Abordagem C dá a actividade que é como tripsina (TLAC), que no caso normal não está presente, o que é positivo por exemplo, na pancreatite, em pacientes em unidades de cuidados intensivos com ativação da coagulação, em amostras de plasma após arrefecimento, ou no reagente de Limulus que é velho. TLAC é expressa em mA / min e tem que ser subtraído de todos valores que foram determinados em A e B.

Como standards para o procedimento, de acordo com a invenção por exemplo, um plasma normal (ou 7% albumina humana), foi analisado com um reatividade basal de LPS (BL) de 0,2-2 ng/ml LPS, em particular de 0,4-1,2 ng / ml LPS, que foi suplementado com 0, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng / ml LPS. Estes padrões de calibração têm por definição reatividades contidas de LPS: 0+BL, 1+BL, 10+BL, 100+BL, 1000+BL, 10000+BL ng/ml de LPS no plasma normal. Outras padrões de calibragem ter contido 0, 0,1, 1, 10, 100 µg/ml de zymosan A. Se necessário, o ensaio pode também ser padronizado com um controle de tripsina (por

exemplo, 100 ng / ml de tripsina em 7% albumina - PBS), a determinar o conteúdo de tripsina ativa na amostra.

Standards foram escolhidos, que tiveram uma matriz - ou seja, uma em torno do analito - que era parecido com o que o analito das amostras foi. Material adequado da amostra é particularmente plasma com citrato ou com EDTA. Quando plasmas com EDTA são analisados as standards também devem conter EDTA.

Se uma amostra com uma matriz que é diferente do plasma está a ser analisada, por exemplo, licor cerebrospinalis, urina, lavado bronquioalveolar, leite, um produto do sangue, um concentrado de factor comercial, ou saliva (saliva contém fisiologicamente 100-500 ng / ml reatividade de LPS, o que é uma razão pela qual o ensaio de Limulus é tão problemático), a amostra deverá ser levada à matriz aproximada de plasma com vaso de plasma ou, se for caso disso, com 7% albumina humana por uma diluição de 1+2 a 1+100, em particular, de 1+4 a 1+9, antes da amostra é analisada no ensaio descrito aqui.

Alternativamente, uma calibração de adição pode ser realizada, isto é, além das quantidades conhecidas de LPS ou de lipídio-A ou de glucano de uma amostra, por exemplo, droga comercial de antitrombina III, e determinação da reatividade de LPS ou de lipídio-A ou de glucano na amostra completada e na amostra não completada.

A diferença de absorção é equivalente ao valor acrescentado de LPS ou de lipídio-A ou de glucano e indica que o valor basal de LPS, de lipídio-A, ou de glucano.

Plasma normal tem cerca de 0,8 ng / ml reatividade de LPS (valor médio = MV; ou seja, ela reage, como se um plasma sem reatividade de LPS foi completado com 0,8 ng/ml LPS. 1 desvio standard (SD) = 0,4 ng / ml reatividade de LPS. Os

coeficientes de variação dentro do ensaio são inferiores a 10%.

Pacientes com sepsis estão tendo até cerca de 200 ng/ml, às vezes > 200 ng / ml reatividade de LPS e/ou até 10 µg/ml, às vezes > 10 µg/ml reatividade de glucano no plasma. O limite inferior de detecção do ensaio, de acordo com a invenção é de cerca de 0,1 ng/ml reatividade de LPS e/ou cerca de 0,1 µg/ ml reatividade de glucano no plasma.

Apenas cerca de 1% do LPS que é adicionado a pool de plasma normal reage no procedimento, de acordo com a invenção como LPS reage após a adição a 7% albumina humana, ou seja plasma contém inibidores de LPS, LPS inibiu não é detectado em o presente processo. Apenas cerca de 10% do glucano que é adicionado a pool de plasma normal reagiu no procedimento, de acordo com a invenção como glucano reage após a adição a 7% albumina humana, ou seja, o actual processo não detectar glucanos neutralizados.

As amostras de plasma devem ser analisadas em forma não diluída, se possível, porque esta imita melhor o reatividade fisiopatológica de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano.

O tempo de incubação à temperatura ambiente (cerca de 23°C) são encurtados 3 vezes, se for incubadas a 37°C. Desde que o sistema de Limulus é extremamente sensível ao calor, a temperatura de incubação não deve exceder os 37°C, se possível.

Apenas valores de deltaA que são menos de 45% do máximo deltaA alcançável são avaliados.

Na lista seguinte a melhor forma de desempenho para abordagem

A é apresentada. Então, o melhor desempenho de formas de abordagens B e C são descritos.

Determinação da reatividade de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano (Abordagem A) 10  $\mu$ l amostra  
 10  $\mu$ l reagente oxidante (60 mM CT)  
 10 min 37°C (ou 30 min RT)  
 10  $\mu$ l reagente de antioxidante (230 mM metionina)  
 3 min RT 30  $\mu$ l reagente de Limulus (p.e. Pyrochrome ®, dissolvido em 3,2 ml de tampão Tris)  
 deltaA/t

Se necessário, teste com cinética linear:

20 min RT ou 40 min RT  
 50  $\mu$ l reagente de linearização (750 mM arginina, pH 8,7)  
 deltaA / t

Determinação da reactividade basal de glucano (Abordagem B)

Como abordagem A, reagente de antioxidante contém também 15000 U / ml polimixina B

Determinação da actividade que é como tripsina (Abordagem C)

Teste sem linearização: como abordagem A, a determinação de um linear deltaA / t nos primeiros 1-10 min RT da abordagem A e B.

Teste com linearização: como abordagem A, reagente de linearização é adicionado antes de (ou eventualmente até 3 min depois), o reagente de linearização; é omitido a incubação de 20 minutos ou 40 minutos antes da adição do reagente de linearização

Se é incubada a 37°C, em vez de RT, os tempos de incubação são encurtados 3x.

Além da reatividade basal de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano (abordagens A,B), a reatividade de LPS e / ou de lipídio-A e / ou de glucano poderia ser testada após mais além de LPS ou de lipídio-A ou de glucanos à amostra. Portanto, a capacidade individual de inibição contra LPS e / ou lipídio-A e / ou glucanos foi testado.

Pacientes com baixa capacidade de inibição da LPS / lipídio-A / glucano (por exemplo, poucos anticorpos respectivos ou baixa LBP no plasma) são mais sensíveis para DIC patológicas. Isto foi testado nas abordagens D ou E que agora estão descritos:

Abordagem D (acrescentado dando a reatividade de LPS e / ou de lipídio-A = capacidade de inibição de LPS e / ou de lipídio-A)  
Abordagem A foi realizada com a variação que a amostra 0,5 peças 1 - 1000, preferiu 2 - 50, especialmente 10 ng / ml LPS foram adicionados e eventualmente anterior à oxidação foi incubado por 1-60 min RT: 100% standard = aumento por 5 ng / ml reatividade de LPS; SD = 50%, os pacientes têm até cerca de 1000 - 10000% da norma.

Abordagem E (acrescentado dando a reatividade de glucano = capacidade de inibição da glucano)  
Abordagem A foi realizada com a variação que a amostra 0,5 partes de 0.1-100, preferiu 0.4-4, especialmente preferido 1 µg/ml zymosan A foram adicionados: 100% standard = aumento por 0,5 µg/ml reatividade de glucano; SD = 20%, os pacientes têm até cerca de 100 - 1000% da norma.

Os exemplos seguintes descrevem o procedimento, de acordo com a invenção sem limitar.

Nas figuras 1 a 24 são apresentados os resultados dos ensaios do processo, de acordo com a invenção.

### Exemplo 1 (Abordagem A)

10 µl plasma do doente e os padrões de plasma com 0, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng / ml reatividade de LPS foram incubados em duplicado com 10 µl 60 mM de chloramine-T ® em PBS durante 10 minutos a 37°C (ou 30 minutos em temperatura ambiente = RT).

Então 10 µl 230 mM metionina em H<sub>2</sub>O foi adicionado. Após 3 min RT 30 µl reagente de Limulus com substrato cromogênico para Limulus S-2834 ® foi adicionado (Pyrochrome ®). A absorção foi determinada após 2 min (RT; valor basal) e após 4 min (RT; controle de tripsina em cinética hiperbólica). Após 20 min (RT), o reagente de linearização foi adicionado, aqui 50 µl 750 mM arginina, pH 8,7 (concentração final 341 mM) e os  $\Delta A / t$  foi determinado.

Este valor corresponde à reatividade da (LPS + lipídico-A + glucano) da amostra.

### Exemplo 2 (Abordagem B).

As condições de incubação foram idênticos aos abordagem A, com uma alteração da standards: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml zymosan A num pool de plasma normal sem glucano. O reagente de metionina contidas também 15000 U / ml polimixina B (PMB). O valor de  $\Delta A$  foi determinado por um pool de plasma normal (sem zymosan A) e foi subtraído de todos os valores de  $\Delta A$  que foram determinados na abordagem B (correção para PMB). O valor de B, que foi corrigido para PMB corresponderam a reatividade de glucano dos amostras respectivas. Os valores que foram determinados na abordagem B, que foram corrigidos para PMB tiveram de ser subtraídos dos que da abordagem A: assim uma got a reactividade de LPS + lipídio-A da amostra [LPS + lipídio-A + glucanos] - [Glucanos] = LPS + lipídio-A.

### Exemplo 3 (Abordagem C).

As condições de incubação foram idênticos aos abordagem A, com a variação que o reagente de linearização foi adicionado antes do reagente de Limulus eo aumento da absorção ( $\Delta A$ ) foi determinada diretamente.

### Exemplo 4 (Abordagem D)

Idênticas condições de incubação como na abordagem A, com a variação de 5  $\mu$ l 10 ng / ml LPS foi acrescentada à amostra e foi incubado por 10 min RT antes da oxidação.

### Exemplo 5 (Abordagem E).

Idênticas condições de incubação como na abordagem A, com a variação de 5  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml zymosan A foi acrescentada à amostra e foi incubado por 10 min RT antes da oxidação.

### Exemplo 6: Cinética hiperbólica com reagente de Pyrochrome ®

1 ml pool de plasma de doentes (com citrato; contendo 1,8 ng / ml reatividade de LPS), com coagulação plasmática normal foi completada com 0 - 10000 ng / ml LPS (Sigma, E. coli B5, gel-filtrada) ou com 1  $\mu$ g/ml zymosan A (Sigma), e ele foi incubado com 1 ml de 60 mM de chloramine-T ® (= CT), em PBS por 10 minutos (37°C) em U - microtiter placas que não continham pirogenio. 1 ml 230 mmol / l metionina em H<sub>2</sub>O foi adicionado (comparável a 3,33  $\mu$ l amostra + 3,33  $\mu$ l 60 mM CT + 3,33  $\mu$ l 230 mM metionina) e após 3 min (temperatura ambiente) 10  $\mu$ l desta mistura foi incubada com 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ou 10000 U / ml polimixina B (OTC Euro Pharma, Kamen, Alemanha), em H<sub>2</sub>O e 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (abordagem 1a) ou 240 mM arginina (abordagem 1b), pH 8,7

(30 mmol / l final) e 20 µl reagente de Pyrochrome ® á temperatura ambiente.

Os valores de absorção do experimento realizado de acordo com exemplo 6 foram determinados após 0 - 44 min (RT) á 405 nm. Os valores representados nas figuras 1-3 foram determinados.

A Figura 1 mostra, que a utilização de 20 µl reagente de Limulus (liofilizado juntamente com substrato cromogênico; quantidade de amostra = 3,3 µl) dá uma deltaA máxima de 470 mA; um deltaA de 100 mA (correspondente a cerca de 20% dos max.deltaA) é resultante com 1,7 ng / ml reatividade de LPS no plasma após 37 min RT, com 3,2 ng / ml reatividade de LPS após 32 min RT, com 6,3 ng / ml reatividade de LPS após 26 min RT, com 15,4 ng / ml reatividade de LPS após 24 min RT, com 42,9 ng / ml reatividade de LPS após 23 min RT, com 125 ng / ml reatividade de LPS após 22 min RT, com 373 ng / ml reatividade de LPS após 18 min RT.

A figura 2 mostra, que a utilização de 3,3 µl amostra, 3,3 µl oxidante, 3,3 µl metionina, 10 µl H<sub>2</sub>O ou arginina e 20 µl reagente de Pyrochrome ® e de incubação de 24 min RT dá uma linearidade de ensaio de Limulus até cerca de 100 - 300 ng / ml LPS completados a plasma normal, correspondente a 300 ng / ml reatividade de LPS. Sem adição de 30 mM (final) arginina (reagente de especificidade), a extinção para 10000 ng / ml reatividade de LPS é apenas por cerca de 5% inferior em comparação com as de 3333 ng / ml reatividade de LPS (● - ● determinação em duplicado) , ou seja, a análise não é inibida por altas doses de LPS.

Se 30 mM arginina é utilizada (reagente de especificidade; ● - ● determinação em duplicado), a reação de Limulus é abrandado, um deltaA de 200 mA após 24 min RT é atingido sem 30 mM arginina por adição de cerca de 100 ng / ml LPS de

plasma, com 30 mM de arginina por cerca de 3000 ng / ml LPS de plasma. Além 50  $\mu$ l de 10000 U / ml PMB inibe todos os acréscimos de LPS até 10000 ng / ml ( $\blacktriangle$ ). Figura 3 demonstra a cinética hiperbólica neste experimento no menor intervalo de LPS adicionado.

Na figura 4 a inibição da LPS pelo polimixina B e da própria actividade basal de polimixina B, relativa ao sistema de Limulus é representado. Por conseguinte, todos os valores de  $\Delta A$  que foram obtidos com polimixina B tinha que ser corrigidos por subtracção do valor basal de  $\Delta A$  de plasma sem glucano. Se assim o valor corrigido de polimixina B é subtraído de que de abordagem A (ver figura 1), a reactividade de LPS e / ou de lipídio-A do paciente é obtida. A Figura 4 mostra, que a adição de 5  $\mu$ l 10000 U / ml PMB resulta em um  $\Delta A$  dos cerca de 70 mAU após 44 min RT mesmo num pool de plasma sem glucano (O).

A figura mostra, que a suplementação de LPS de até 371 ng / ml ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ , x,  $\Delta$ , Q) a plasma normal é totalmente neutralizada pela PMB nos primeiros 44 min RT do tempo de reacção de Limulus. 1000 ng / ml de zymosan A com PMB (+) ou sem PMB ( $\blacklozenge$ ) podem ser detectados sem interferências; (-) mostra a diferença de 1000 ng / ml zymosan A (ZyA) com PMB (+) menos o próprio controle de PMB (O).

A figura 5 mostra, como uma cinética linear pode ser gerada na execução do procedimento, de acordo com a invenção. Portanto e.g. a cinética de abordagem 1b foi linear através da adição de 50  $\mu$ l 750 mM arginina, pH 8,7 (concentração final de arginina  $30+417 = 447$  mmol/l) 23 min a RT após a adição do reagente de Limulus.

Abordagem A com 30 mM (final) arginina, que está representado

na figura 5, foi linear com 50  $\mu$ l 750 mM arginina (●); deltaA lineares são resultantes, aqui representado como aumento / 15 min RT. Ela dá uma linearidade do teste de até cerca de 300 ng / ml reatividade de LPS. Mesmo 10000 ng / ml reatividade de LPS não resulte em um efeito inibitório por doses elevadas. Adição de 5  $\mu$ l 10000 U / ml de PMB neutraliza a reatividade de LPS até 10000 ng/ml (▲), se o momento de linearização é RT 23 min.

Nas figuras 6 e 7, o desempenho do processo, de acordo com a invenção é apresentada, utilizando uma cinética hiperbólica com reagente de Coamatic ®, em comparação a uma cinética hiperbólica com reagente de Pyrochrome ®.

Portanto 10  $\mu$ l pool de plasma normal, que tinha sido completado com 0 -100 ng / ml LPS, foi incubado com 10  $\mu$ l 60 mmol / l CT durante 10 min a 37 ° C. 10  $\mu$ l 200 mmol / l metionina com 2000 U / ml de polimixina B (Sigma), foram aditados e após 3 min RT 30  $\mu$ l de reagente LAL Coamatic ® (Chromogenix, Mölndal, Suécia) foram adicionados ea reação foi incubado a 23°C ou a 37°C.

Figura 6 mostra que 20% da máxima deltaA são cerca de 200 mA; este deltaA é atingido após 40 minutos de RT por + 100 ng / ml LPS, após 50 min de RT por + 50 ng / ml LPS, após 60 min de RT por + 25 ng / ml LPS, após 70 min de RT por + 12,5 ng / ml LPS, depois de 75 min de RT por + 6,3 ng / ml LPS, após 100 minutos de RT por + 3,1 ng / ml LPS, após 120 min de RT por + 1,6 ng / ml LPS, após 140 min de RT por + 0,8 ng / ml LPS, depois de cerca de 270 minutos de RT por + 0 ng / ml LPS. O reagente de Coamatic ® é substancialmente mais insensível para LPS que o reagente de Pyrochrome ®. Figura 7 mostra a influência da adição de ascorbato (Asc) e de metionina (Met) no procedimento, de acordo com a invenção. Portanto, um pool de plasma normal foi completado com 0-100 ng

/ ml LPS. 10 µl mesmas foram incubados com 10 µl 60 mmol / l CT durante 10 min a 37°C. 10 µl 210 mmol / l ascorbato ou 210 mmol / l metionina, com ou sem 210 mmol / l arginina, com ou sem 2000 U / ml polimixina B foram acrescentados. Após 3 min na RT 30 µl de reagente LAL Coamatic ® foram adicionados ea reação foi incubado a 37°C; deltaA foi medido. Um vê que ascorbato e metionina estão aptos a neutralizar a oxidação. Figura 7 mostra que o valor de + 0 ng / ml LPS só pode ser correctamente avaliada depois de um prolongamento do tempo de incubação de mais de 100 min RT. O prolongado tempo de incubação permite uma melhor determinação da reactividades de LPS abaixo de 5 ng / ml.

Figura 8 demonstra, que 2000 U / ml PMB inibem completamente apenas até cerca de 20 ng / ml LPS-reactividade, que 50 ng / ml LPS, apesar de 2000 U / ml PMB dá um deltaA adicional de 100 mA, que corresponde a um reatividade de LPS de + 1 ng / ml. 30 mM arginina inibe o sistema de Limulus da Coamatic ® substancialmente inferior ao das Pyrochrome ®. As figuras 7 e 8 estão demonstrando, que o reagente de Coamatic ® tem uma cinética substancialmente mais lento do que o reagente de Pyrochrome ®, ou seja reagente de Coamatic ® contém menos factor C, mas mais substrato cromogênico que Pyrochrome ®.

Na figura 9 de um procedimento de acordo com a invenção é apresentado, em que a reatividade de 100 ng / ml zymosan A num pool de plasma normal foi determinado. Portanto 10 µl pool de plasma normal foi completado com 0 ou 100 ng / ml zymosana e com 10 µl 60 mmol / l CT e, em seguida, a reação foi incubado por 10 minutos a 37°C. Então 10 µl 200 mmol / l metionina com 2000 U / ml polimixina B foram acrescentados. Após 3 min (RT) 30 µl de reagente LAL Coatest ® (factores de Limulus não liofilizados juntamente com um substrato cromogênico) foi adicionado. Depois de 40 minutos

a 37°C 75 µl 750 mM arginina, pH 8,7 e 25 µl 2 mmol / l CS-2834 ® foram adicionados eo aumento da absorção de RT foi medido. Figura 9 demonstra, que 100 ng / ml zymosan pode ser medido claramente.

Figura 9 mostra, que o aumento máximo é de cerca de 1800 mA, obtido por 25 µl 2 mM S-2834 ®, o que corresponde a 30 µl 1,7 mM cromogênico substrato (CS), ou seja, no reagente de Coamatic ® são cerca de 0,55 mM CS e no reagente de Pyrochrome ® são cerca de 0,33 mM CS liofilizado, juntamente com LAL-fatores.

Figura 10 mostra os resultados de um procedimento de acordo com a invenção, em que 10 µl pool de plasma normal, que tinha sido completado com 0 - 100 µg/ml zymosan A, foi incubado com 10 µl 60 mmol / l CT, 30 mmol / l NaHCO<sub>3</sub> para 30 min a RT. Posteriormente, 10 µl 215 mmol / l metionina, 150 mmol / l arginina, pH 8,7, e 1000 U / ml polimixina B foi adicionado, e após 3 min (RT) 15 µl de reagente LAL Coamatic ® foi acrescentado e um delta A foi determinada. O teste é linear até 2 µg / ml zymosan A.

Figura 11 mostra os resultados de um procedimento de acordo com a invenção, em que 10 µl plasma normal (Citrol; DadeBehring, Marburg, Alemanha), completados com 0-1000 ng / ml LPS foram incubados com 10 µl 60 mmol / l CT . Após 30 min a RT 10 µl 210 mmol / l arginina, 210 mmol / l ascorbato de sódio e 30 µl de reagente LAL Coamatic ® foi acrescentado e deltaA em 405 nm foi medido. Figura 11 mostra a cinética em temperatura ambiente.

De figura 11, pode ser visto, que um deltaA de 200 mA, ou seja, cerca de 20% da máximo delta A, é atingido por + 1000 ng / ml LPS após 20 min RT, para + 500 ng / ml LPS após 25 min RT, para + 250 ng / ml após LPS + 30 min RT, para + 125 ng /

ml LPS após 32 min RT, para +63 ng / ml LPS após 37 min RT, para + 31 ng / ml LPS após 45 min RT , por + 8 ng / ml LPS após 57 min RT, por + 4 ng / ml LPS após 72 min RT, para + 1 ng / ml LPS após 80 min RT, para + 0 ng / ml LPS após RT 108 min.

Assim, a cinética de LPS com Coamatic ® é substancialmente mais lenta do que com Pyrochrome ® (figura 1), particularmente em relação às amostras que tinham sido completadas com quantidades baixas de LPS (aqui pelo factor 2-3). Figura 12 mostra os resultados de um procedimento de acordo com a invenção, na qual 10 µl 0-20% albumina humana que tinha sido completado com 5 ng / ml LPS foi incubado com 10 µl 60 mmol / l CT durante 10 min a 37°C. Então 10 µl 200 mmol / l metionina e 30 µl de reagente LAL Coamatic ® foi acrescentado e delta A a RT foi medido. É reconhecida a forte dependência do teste do Limulus sobre o teor de proteínas da amostra.

Figura 12 mostra, que um aumento da concentração de albumina da amostra de 0% a 1% resulta em uma diminuição da reatividade de LPS a cerca de 1/5 do valor inicial. Se a concentração de albumina é elevada a cerca de 2%, então o valor inicial resultados novamente. Se a concentração de albumina da amostra continua a aumentar de 2% para 10%, então a reactividade de LPS cai a 1/3 do valor inicial, um novo aumento da concentração de albumina da amostra de 10% para 20% não resulte em uma mudança da reatividade de LPS da amostra. Assim, albumina estabiliza LPS (por exemplo, contra vinculativo à parede de plástico da placa), mas, ao mesmo tempo que inibe a reactividade do LPS com factores de Limulus.

Figura 13 mostra os resultados de um procedimento de acordo com a invenção, na qual 10 µl pool de plasma normal (NPG), que tinha sido completado com 0 - 6667 ng / ml zymosan A foi incubado com 10 µl 60 mmol / l CT durante 10 min a 37°C. Então

10  $\mu$ l 200 mmol / l metionina e 30  $\mu$ l de reagente LAL Coamatic® foi acrescentado e  $\Delta A$  foi medido a RT. Uma reconhece a linearidade (relação de concentração de glucano a  $\Delta A$  resultante) do teste do Limulus para glucanos aqui até uma concentração plasmática de cerca de 2  $\mu$ g/ml glucanos.

As figuras 14 e 15 mostram os resultados de um procedimento de acordo com a invenção, em que 10  $\mu$ l amostra (NPG, NPG acrescido de 3,2 mg / ml EDTA, NPG plus 70 UI / ml heparina) completado com 0 ou 10 ng / ml LPS foi incubado com 10  $\mu$ l 0-133 mmol / l no CT H<sub>2</sub>O durante 10 minutos a 37°C. Então 10  $\mu$ l 200 mmol / l ascorbato e 30  $\mu$ l de reagente LAL Coamatic® foram acrescentados. Figura 14 (para plasmas que foram completadas com 10 ng/ml) e número 15 (de plasmas sem suplementação) mostram, que as concentrações de CT de 40-80 mmol / l são ótimas para eliminar o efeito da heparina.

Figura 14 mostra, que, sem oxidação não parecem mensuráveis reactividade de LPS dentro 50 min RT. 70 UI / ml heparina na amostra estimulando o LPS-actividade cerca de 5 vezes, quando um reagente de oxidante com  $\geq 60$  mM CT é usado. Desde o procedimento, de acordo com a invenção deve-se imitar reactividades fisiopatológicas de LPS e / ou lipídio-A e / ou glucanos com receptores humanos de LPS e / ou lipídio-A e / ou glucanos (por exemplo, CD 14 ou phospholipasas de monócitos), em vez de tubos com heparina - como, de acordo com o estado da técnica -, de acordo com a presente invenção preferencialmente tubos que contêm citrato ou EDTA são recomendados para a amostragem de sangue.

Figura 15 mostra, que, sem oxidação não parece apenas uma reactividade do Limulus de  $< 100$  mA/19 h RT para plasma normal. Além 40-80 mM CT aumenta a reatividade mais de 10 vezes. Pelo menos 60 mM CT no reagente de oxidante são necessárias para dar uma reatividade similar de LPS em plasmas

com heparina (70 UI / ml na amostra), em comparação a um pool normais de plasma com EDTA ou citrato.

Figura 16 mostra os resultados de uma outra invenção, de acordo com a invenção, em que 10 µl 0-133 mmol / l CT em 100 mmol / l de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5, foi incubado por 10 minutos (37°C), com 10 µl de pool de plasma com coagulação normal (NPG) ou 7% albumina humana (Kabi, Estocolmo, Suécia), cada um deles tinha sido completado com 0 ou 10 ng/ml LPS e/ou 1000 ng/ml zymosan A (ZyA). Posteriormente 50 µl 200 mmol / l metionina foram adicionados e após 3 min na RT 30 µl de reagente LAL Coamatic ® foram adicionados e delta A foi determinado após 93 min a RT. A concentração óptima de CT neste experimento é de cerca de 60 mmol / l.

Figura 16 mostra que, para um vaso de plasma normal, que não tinha sido completado e que tinha sido completado com LPS ou ZyA, reactividades máximas de LPS ou de glucano são resultantes, se o reagente de oxidante contém 40-80 mM CT. No máximo de oxidante, pool de plasma normal (NPG) + LPS + ZyA tem uma baixa reatividade de endotoxina de cerca de 30% do NPG + LPS. Oxidação com > 60 mM CT dá uma diminuição da actividade de Limulus na amostra de 7% albumina humana, com > 60 mM CT ZyA parece ser cada vez mais destruída. LPS no plasma é destruída dose-dependentemente por oxidação com > 90 mM CT.

Figura 17 mostra os resultados de um outro processo, de acordo com a invenção, em que 10 µl 0-133 mmol / l CT em 100 mmol / l de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 foi incubado com 10 µl 7% albumina humana que tinha sido completado com 10 ng / ml LPS (●) ou com 10 ng / ml LPS e 1000 ng / ml Zymosan A (■) por 10 minutos a 37°C. 50 µl 200 mmol / l metionina foi adicionada e após 3 min RT 30 µl LAL-reagente Coamatic ® foi acrescentado e um delta em 405 nm foi medido. Figura 17 mostra os resultados de diferentes

concentrações de CT, mais de 80 mmol / l CT são inativadoras de endotoxina.

Do quadro 17 é reconhecido, que LPS-reatividades maximais ocorrem por oxidação com 20-60 mM CT, que a maior concentração de oxidante se traduz numa diminuição da reatividade LPS, e que LPS na amostra de albumina parece ser cada vez mais destruída por oxidação com > 80 mM CT.

Figura 18 demonstra os resultados dos novos procedimentos, em que n = 24 plasmas com EDTA não selecionados dos pacientes foram analisados por meio de teste de LAL Coamatic ® e foram tratados por calor (10 vezes diluídos com H<sub>2</sub>O, para 15 minutos a 75°C ) ou com 60 mmol / l CT. É reconhecido (fig. 18), que os processos geram diferentes resultados de reatividade (tratamento por calor: 1,8 ng / ml LPS +- 1,6 ng / ml; tratamento por CT: 2,8 ng / ml + - 1, 6 ng / ml, o factor de correlação  $r = 0,210$ ).

Figura 19 mostra os resultados da reatividade de outros processos, em que 5 µl 0 ou 10 ng/ml LPS foram adicionados à amostra e foram testadas no ensaio oxidativo com o reagente de Coamatic ®. Inicial 2,8+-1,6 ng / ml LPS tornou após a adição de LPS a 6,2 ng / ml +- 3,8 ng/ml, o factor correlação  $r = 0,574$ .

Figura 20 mostra os resultados dos novos procedimentos, em que a adição de 5 µl 10 ng / ml LPS dá 5,8 +- 4,6 ng / ml após LPS inicial 1,5 +- 1,1 ng / ml e após o tratamento por calor das amostras; factor é a correlação  $r = 0,024$ . Este factor de correlação é substancialmente menor do que por oxidação das amostras ( $r = 0,574$ ), ou seja, existe uma grande variação interindividual em adição e reconquista de LPS com o teste com tratamento por calor (fortemente desnaturação), em contraste com o método de oxidação .

Figura 21 mostra os resultados da reatividade de novos processos, em que 10  $\mu$ l NPG (pool de 12 plasmas normais; ●), que tinha sido completado com 0 - 10 ng / ml LPS foi incubado com 10  $\mu$ l 60 mmol / l CT durante 10 min em 37°C. Então 10  $\mu$ l 210 mmol / l ascorbato, 210 mmol / l arginina, pH 8,7, foram acrescentados. Após 3 min na RT 30  $\mu$ l de reagente LAL (Coatest®, Chromogenix; dissolvido em 1,4 ml H<sub>2</sub>O; sem substrato cromogênico) foram adicionados, e após 0-90 min a RT 75  $\mu$ l 750 mmol / l arginina, pH 8,7 e 30  $\mu$ l 2 mmol / l Ile-Glu-Gly-Arg-pNA foram adicionados e os linear delta A em 405 nm foi determinado. De figura 21 é reconhecido, que o óptimo ponto de tempo para linearização nesta abordagem é 45 min RT (a curva de calibração do LPS é linear até 10 ng / ml LPS). Além disso, a cifra 21 demonstra que tempos de incubação de Limulus > 60 min RT resultam em uma diminuição de LPS-reactividades (◆, ▲). Isto é devido a uma auto-destruição dos factores de Limulus, presença de substrato cromogênico (como no cinética hiperbólica antes da adição do reagente de linearização) protege contra este.

Figura 22 mostra os resultados dos novos procedimentos, em que 10  $\mu$ l NPG (a partir de 12 plasmas normais) complementado com 0-100 ng / ml LPS ou 0-100  $\mu$ g / ml zymosan A foram incubados com 10  $\mu$ l 60 mmol / l CT por 10 minutos a 37°C. Posteriormente 10  $\mu$ l 210 mmol / l arginina, 210 mmol / l ascorbato (LPS + glucanos) ou com 2000 U / ml de polimixina B (teste de glucanos; teste de ZyA) e 30  $\mu$ l de reagente LAL Coamatic® foram adicionados e deltaA foi determinado. Figura 22 mostra, que ocorre aqui uma linearidade até 2  $\mu$ g/ml zymosan A ou até 100 ng / ml LPS. Concentrações de LPS > 40 ng/ml não podem ser totalmente inibidas por 2000 U / ml polimixina B.

Figuras 23a-c mostram os resultados dos novos procedimentos, em que 200  $\mu$ l NPG (○), NPG + 50 ng/ml LPS (●) ou + 91 ng/ml

LPS (x), NPG + 50 µg/ml ZyA (▲) foram incubadas com 200 µl 60 mmol/l CT no H<sub>2</sub>O durante 10 minutos a 37°C. 20 µl foram incubadas com 10 µl 210 mmol/l arginina, 210 mmol/l ascorbato e 0-250000 U / ml polimixina B a 37°C e deltaA foi determinado. Desde as figuras 23a-c, pode ser reconhecido, que o própria polimixina B estimula o sistema de Limulus.

Figura 24 mostra uma experiência de comparação do processo, de acordo com o estado da técnica com o tratamento de 75°C (15 min) das amostras com o procedimento, de acordo com a presente invenção com a oxidação das amostras com 60 mM chloramine-T ® (10 min, 37°C). Aqui 7,5% albumina humana (Kabi, Estocolmo, Suécia), com 0,5 µg/ml zymosan A basal, tinham sido completados com 0-10000 ng / ml LPS (E. coli 0111: B4; purificada por filtração com gel; produto L 3012 : Sigma, Deisenhofen, Alemanha) ou com + 0-100 µg/ml zymosana foram analisados como segue:

#### A. Tratamento por calor

20 µl amostra foi 10 vezes diluído com H<sub>2</sub>O e incubada durante 15 minutos a RT ou a 75°C (banho de água). Então 20 µl de amostra assim tratada foram incubadas em duplicado com 20 µl de reagente LAL (Pyrochrome ®) na RT e os deltaA a 405 nm foi determinada utilizando um fotômetro que trabalha com placas microtiter (Milenia-DPC, Los Angeles, E.U.A.). Figuras 24a e b demonstram as seguintes abordagens:

+ 0 ng / ml LPS (O), + 0,1 ng / ml LPS (cinzento Δ), + 1 ng / ml LPS (cinzento ◇), +10 ng / ml LPS (cinzento □), +100 ng / ml (●), +1000 ng / ml LPS (▲), +0,1 µg/ml ZyA (Δ), +1 µg/ml ZyA (◇), +10 µg/ml ZyA (□), +100 µg/ml ZyA (\*). Um vê que +1000 ng / ml LPS após o tratamento pelo calor age como +0,1 ng/ml LPS em RT (Fig. 24a), ou seja, 99,99% do LPS activo foi

inactivado por tratamento de calor (Fig. 24b). Zymosan A é resistente ao calor.

#### B. Tratamento por oxidação

5 µl amostra foram incubadas em duplicado com 5 µl PBS ou 60 mM chloramine-T ® em PBS durante 10 minutos a 37°C (banho de água). Então 5 µl 230 mM metionina em H<sub>2</sub>O foram acrescentadas e após 3 min RT 15 µl de reagente LAL (Pyrochrome ®), foram adicionadas e deltaA em 405 nm (RT) foi determinada. É reconhecido que tanto a reatividade de LPS (Fig. 24c) a reactividade de zymosan é resistente à oxidação (Fig. 24d).

Lisboa, 11 de Dezembro de 2008 .

## Reivindicações

1. Procedimento para determinar o conteúdo de lipopolisacarídeo e / ou de lipídio-A e / ou de glucano em líquidos biológicos em um valor de pH entre 6 e 10, compreendendo

- A) tratamento da amostra com pelo menos um oxidante fora do grupo de geradores de oxigênio singulet,
- B) adição de, pelo menos, um factor de amebócitos de *Limulus* à amostra oxidada e,
- C) determinação da activação de, pelo menos, um factor de amebócitos de *Limulus*.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de que, como um oxidante chloramine, é particularmente chloramine-T ® (N-cloro-toluol-sulfamida).

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de que o oxidante é adicionado à amostra, de um montante de 15-200  $\mu$ moles, particularmente 30-120  $\mu$ moles, especialmente preferido 50-70  $\mu$ moles por ml de líquido da amostra.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por após o desempenho da oxidação o montante remanescente do oxidante ser inactivado por adição de um antioxidante, particularmente através da adição de um inibidor de oxigênio singulet, de preferência ascorbato ou metionina.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a activação de, pelo menos, um elemento do sistema de

Limulus ser determinada pela medição da quantidade de chromophore que é gerado pelo sistema de Limulus fora de um composto cromogênico que pode ser degradado por um factor activado de Limulus.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o biológico líquido ser sangue, produtos de sangue, licor, urina, saliva, lavado bronquioalveolar, ascite, derrame pericárdica ou derrame, leite, líquidos de tecidos, líquido linfático, e particularmente plasma.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de que um líquido biológico contendo heparina é utilizado tendo sido completado, antes do ensaio, ou durante o ensaio com, pelo menos, um inibidor de heparina.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por líquido biológico usado que não contenha heparina, ou que contenha até 1 UI / ml de heparina, contém citrato ou EDTA.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a cinética do processo ser linear, antes ou durante a execução do passo c), com um reagente que contém, pelo menos, um composto de guanidina e / ou uma substância caotropica.

10. Processo de acordo com a alegação 9, caracterizado pelo facto de que, como composto de guanidina arginina, e / ou como um agente caotropico é usado um catião de um alcali-metal e / ou um cátion de um terra-alcali-metal.

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado para diferenciar entre reactividade de LPS

e lipídio-A e de glucanos e reactividade de glucanos na presença e na ausência de um inibidor de LPS, e que reactividades que foram determinados em ambas abordagens de teste são subtraídas umas das outras, de modo a avaliar a reactividade causada por LPS e / ou lipídio-A.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por ser utilizada polimixina-B como inibidor do LPS.

13. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o líquido biológico antes ou durante a etapa a) ser diluído com albumina (humana).

14. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o líquido biológico ter uma concentração de proteína de 30-100 g/l, especialmente dos 60 - 90 g / l.

15. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uma quantidade definida de LPS e / ou lipídio-A ser adicionada à amostra e ao conteúdo de lipopolisacaríde para avaliar a capacidade de inibição de LPS e / ou lipídio-A.

16. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uma quantidade definida de glucano ser adicionada à amostra e ao conteúdo dos glucanos para avaliar a capacidade de inibição do glucano.

Lisboa, 11 de Dezembro de 2008

Fig. 1

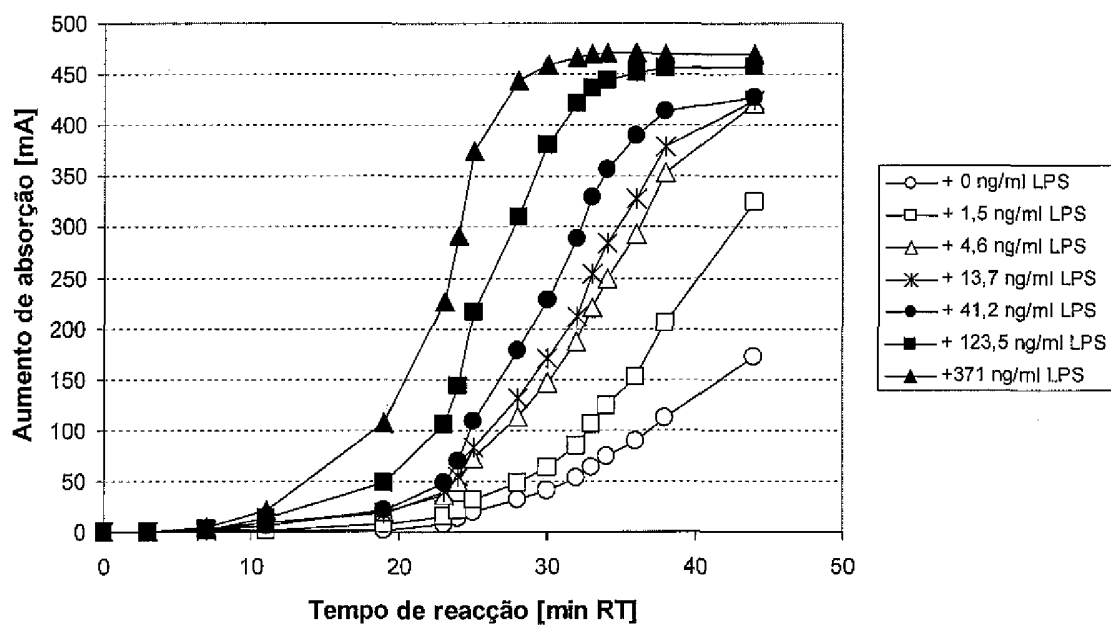


Figura 1

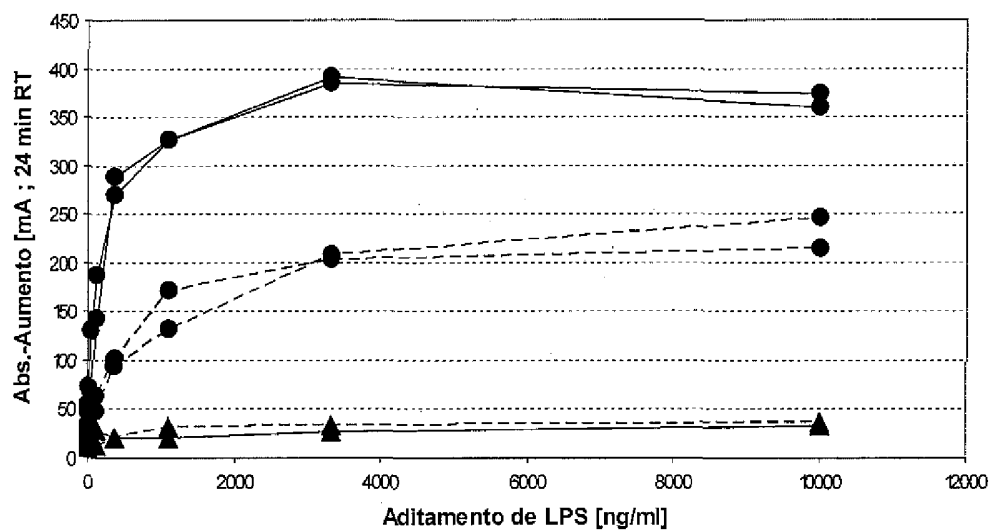
Fig. 2  
Legenda como na figura 3

Figura 2

Fig. 3

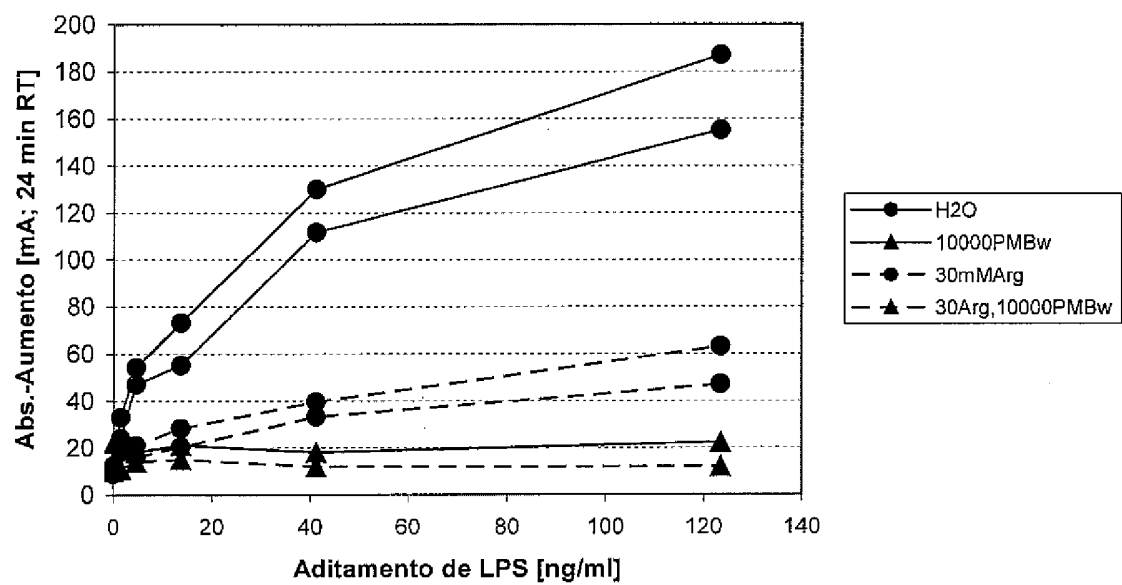


Figura 3

Fig. 4

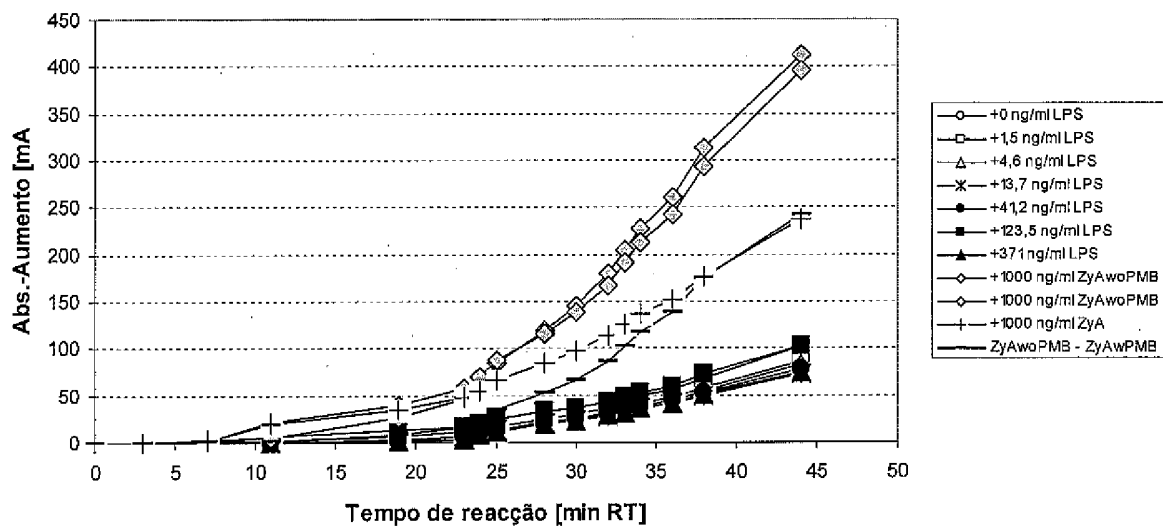


Figura 4

Fig. 5

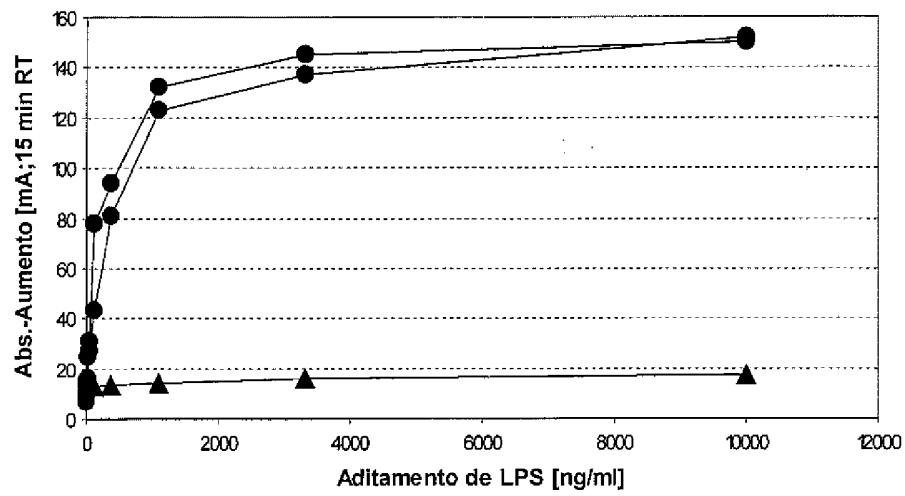


Figura 5

Fig. 6

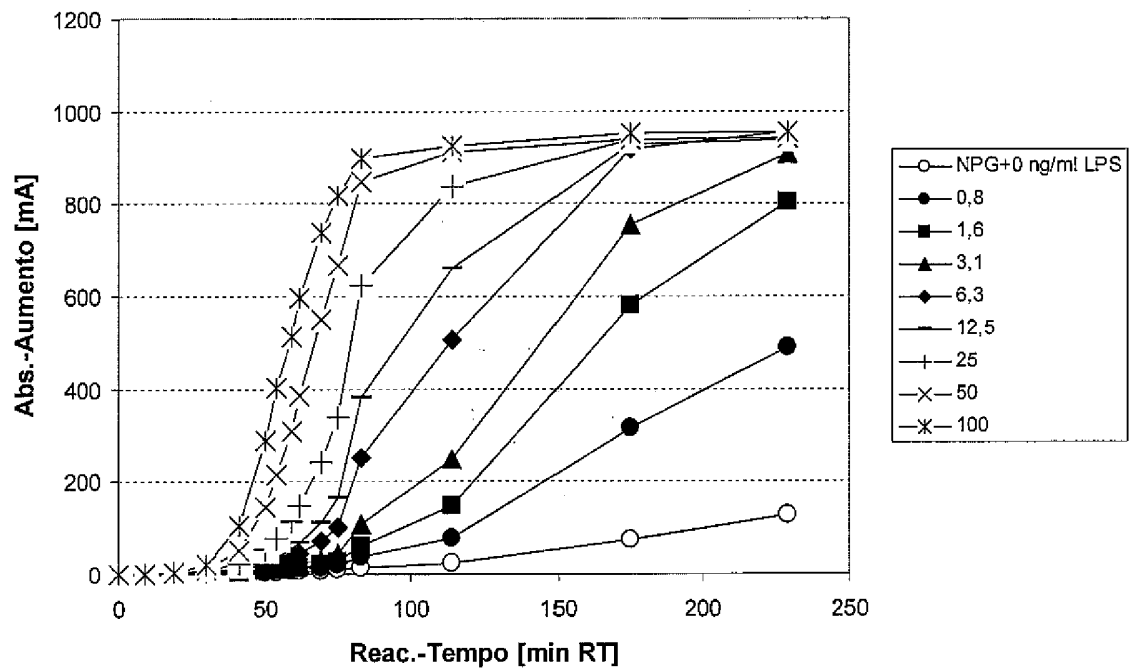


Figura 6

Fig. 7  
Legenda como na figura 8

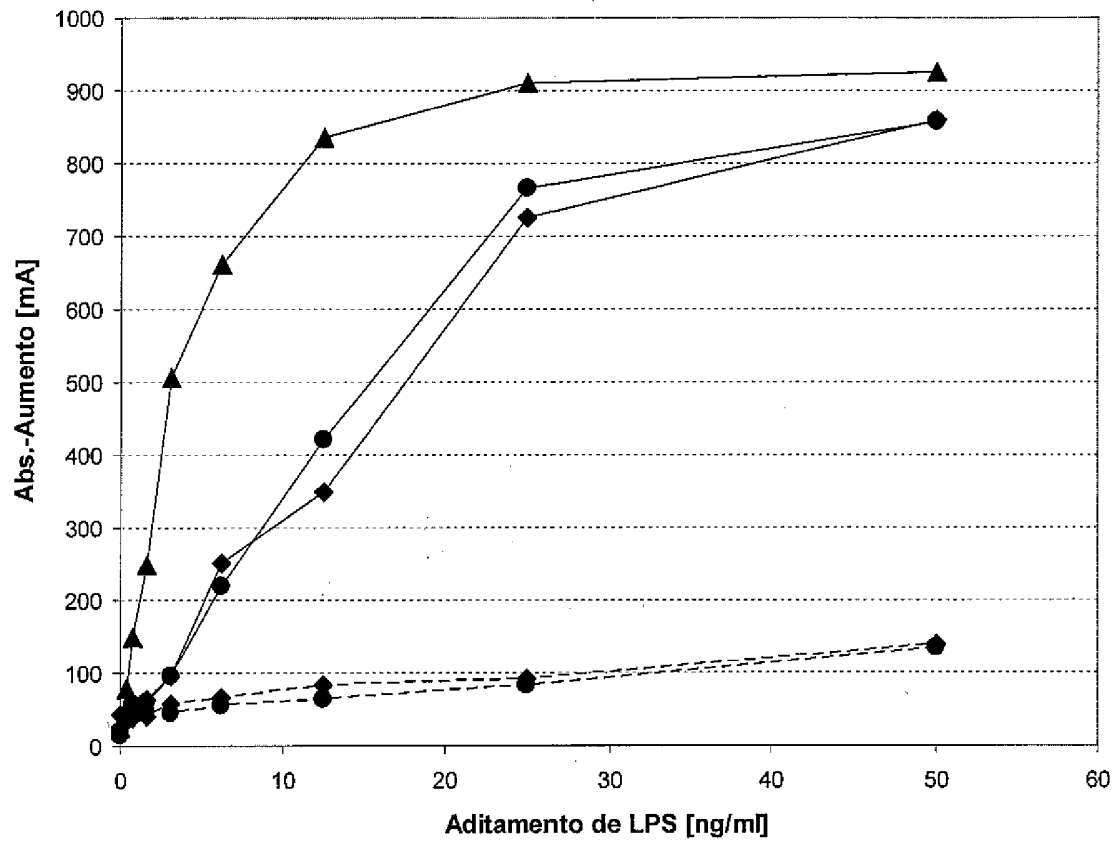


Figure 7

Fig. 8

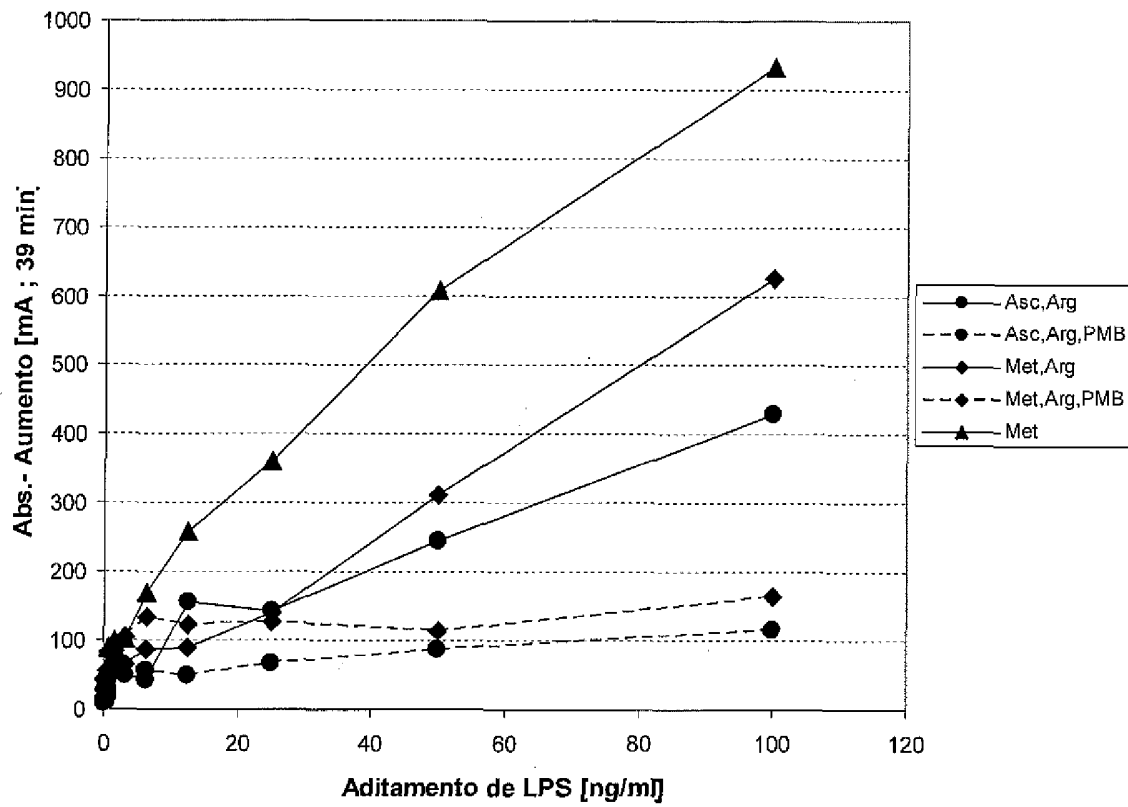


Figura 8

6/25

Fig. 9

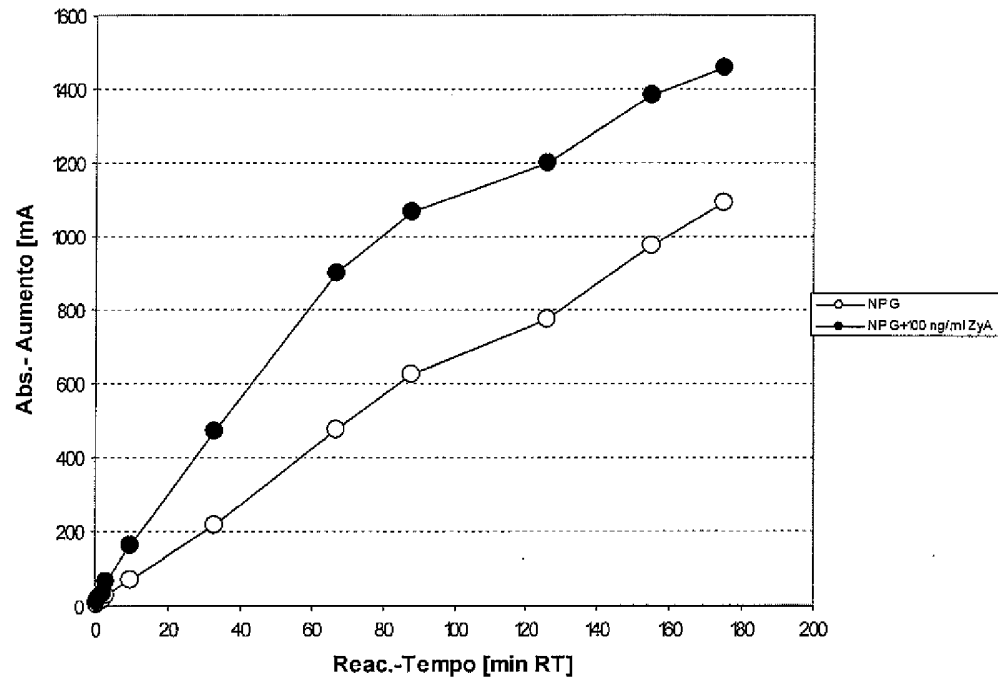


Figura 9

7/25

Fig. 10

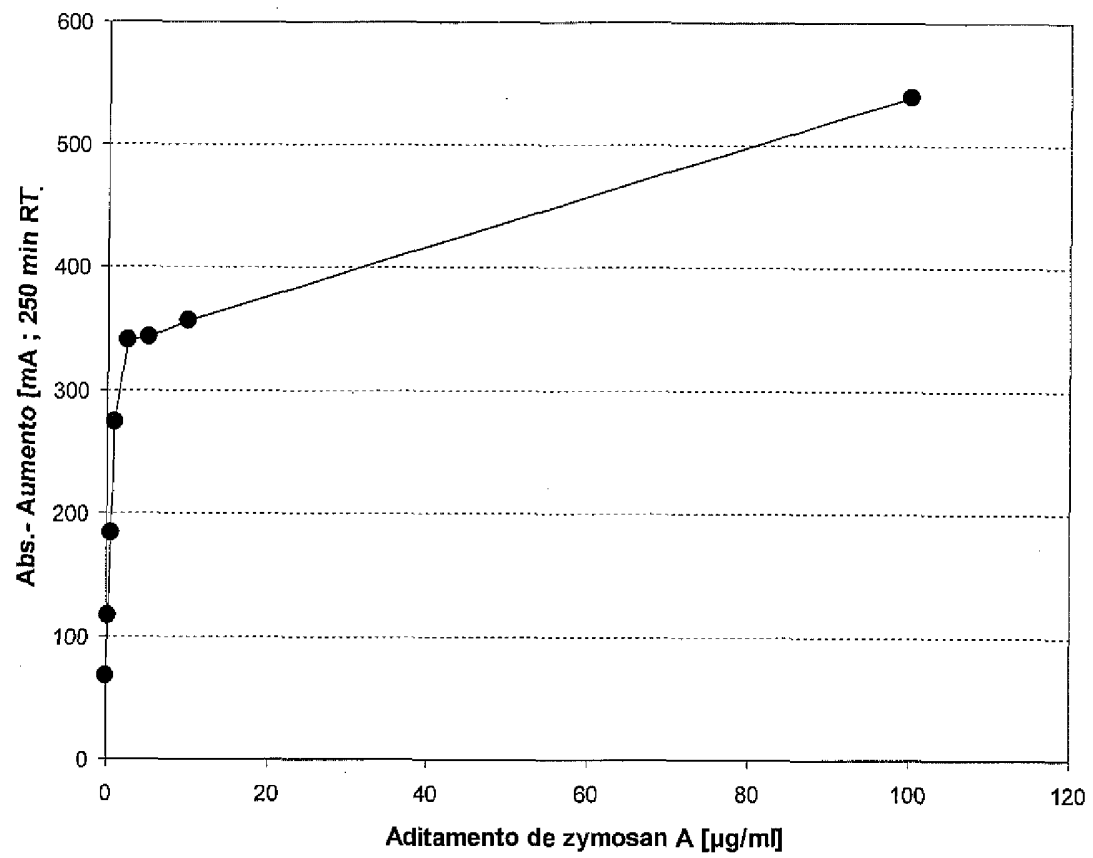


Figura 10

Fig. 11

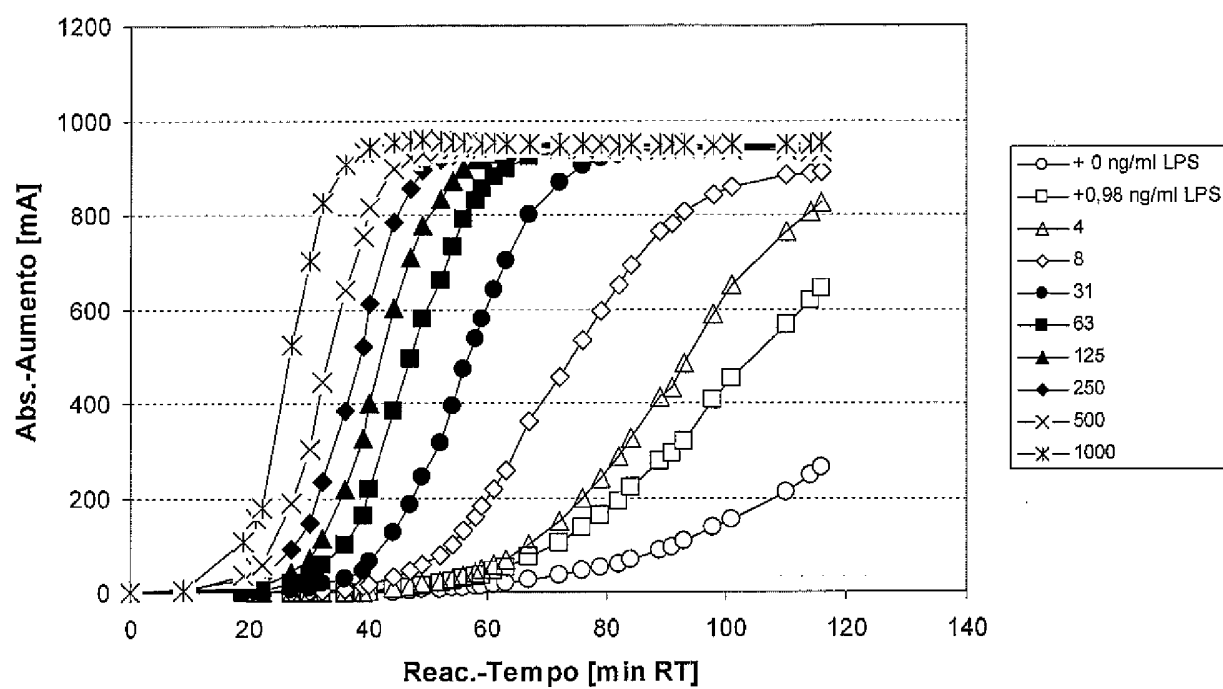


Figura 11

Fig. 12

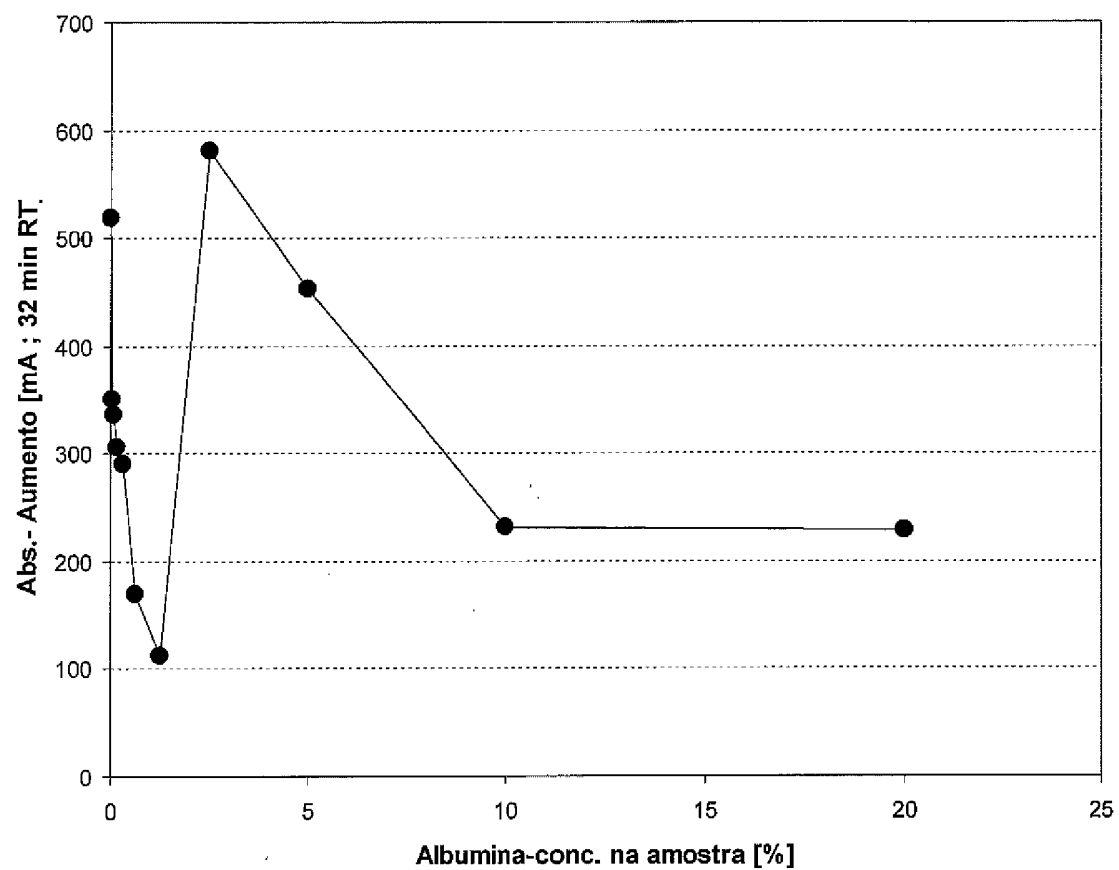


Figura 12

Fig. 13

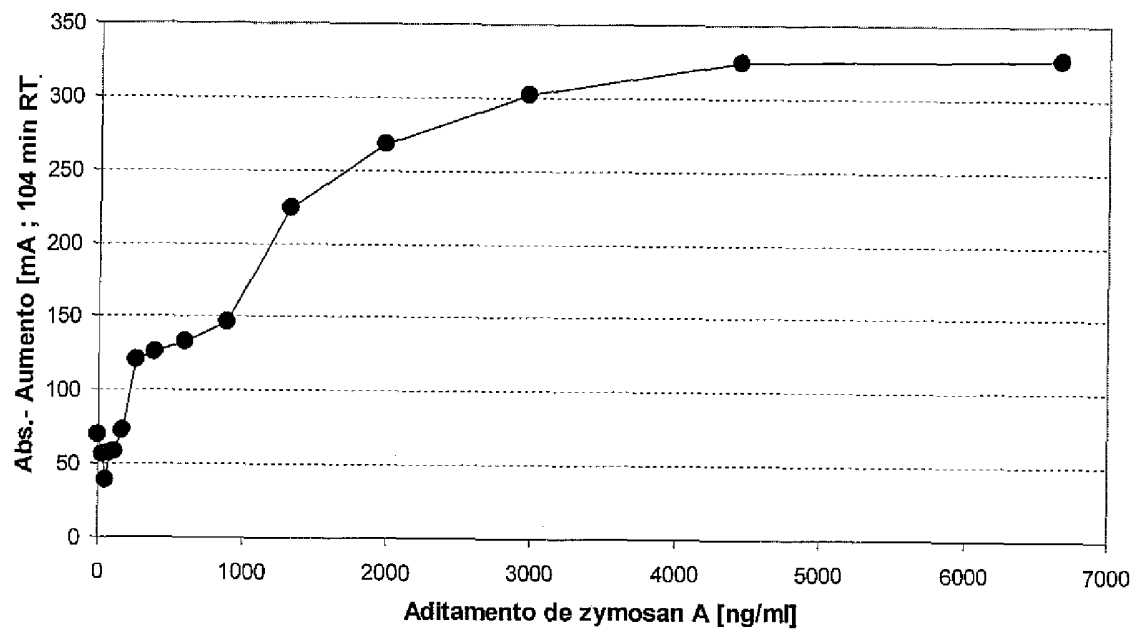


Figura 13

Fig. 14

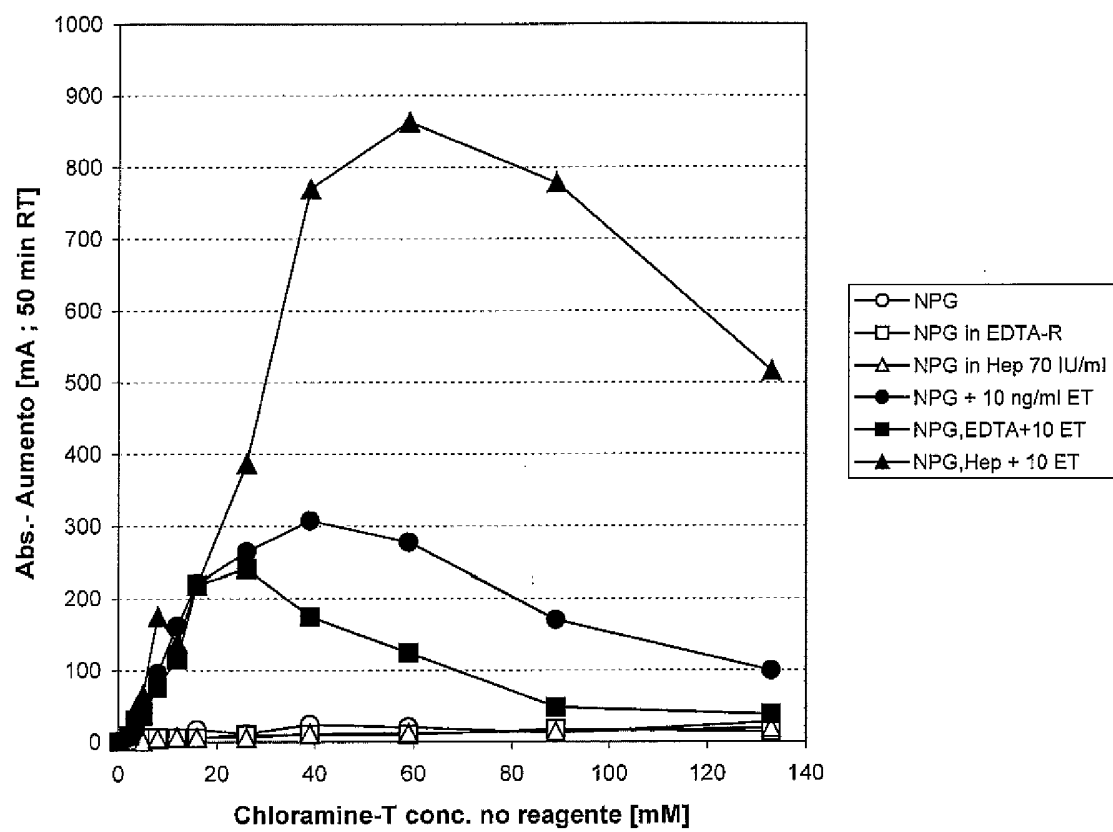


Figura 14

Fig. 15

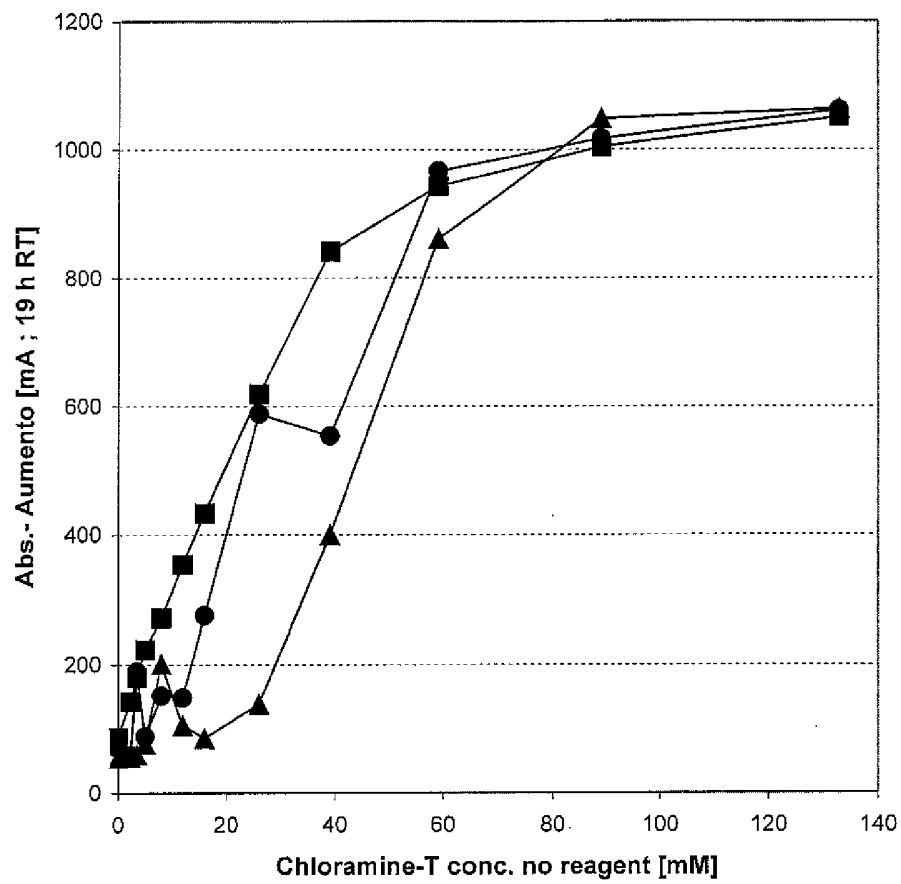


Figura 15

Fig. 16

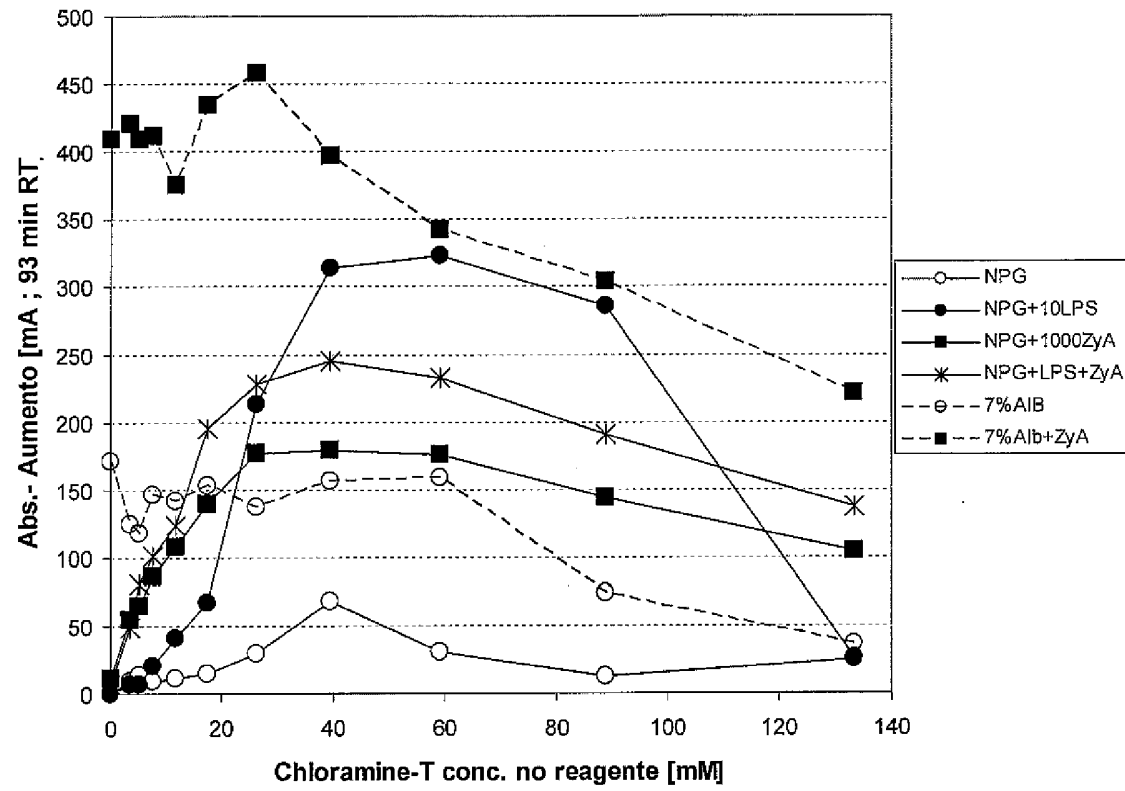


Figura 16

Fig. 17

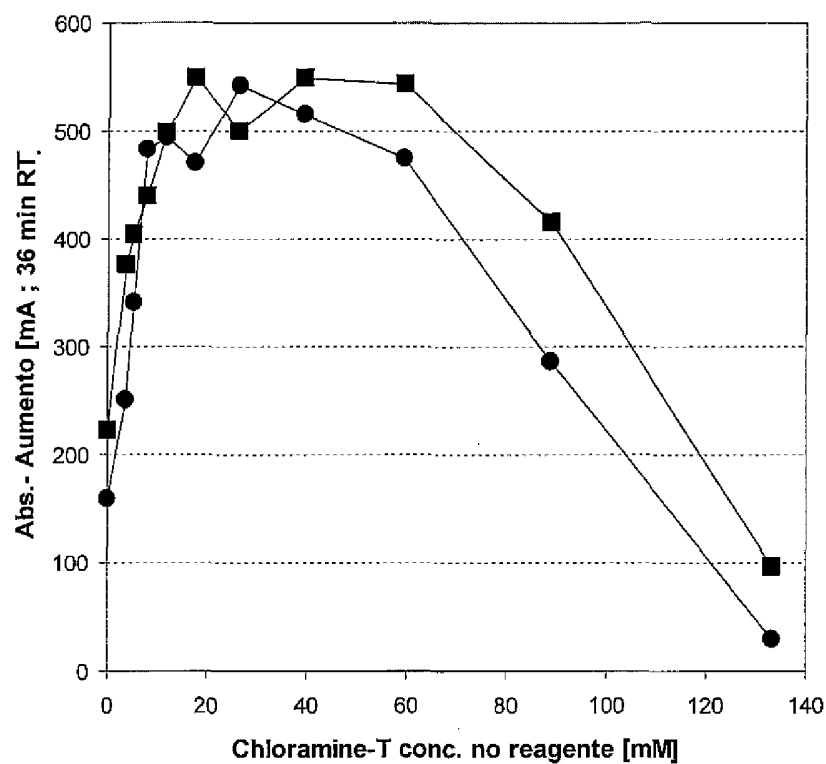


Figura 17

Fig. 18

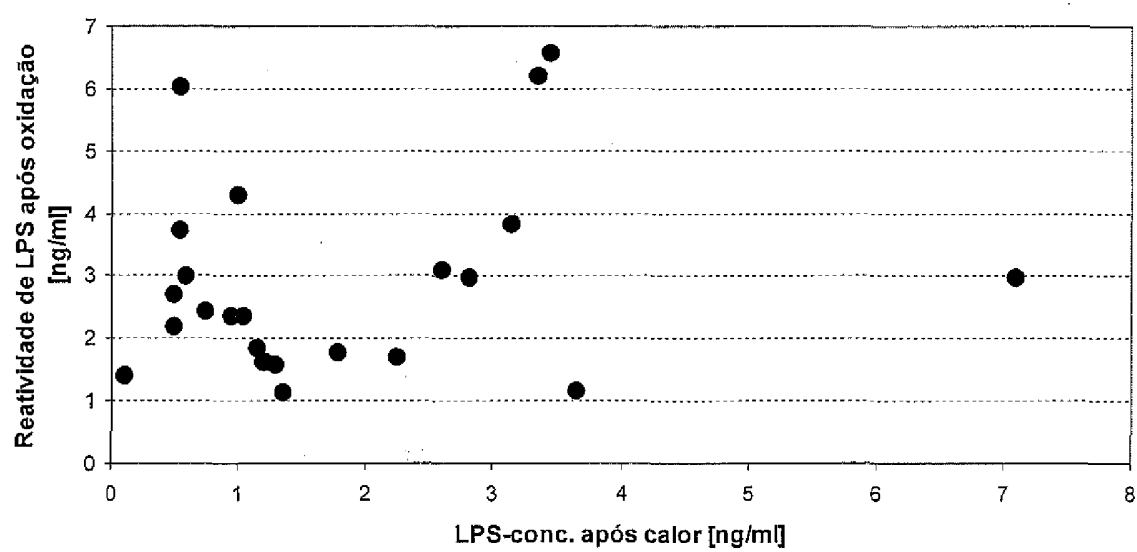


Figura 18

Fig. 19

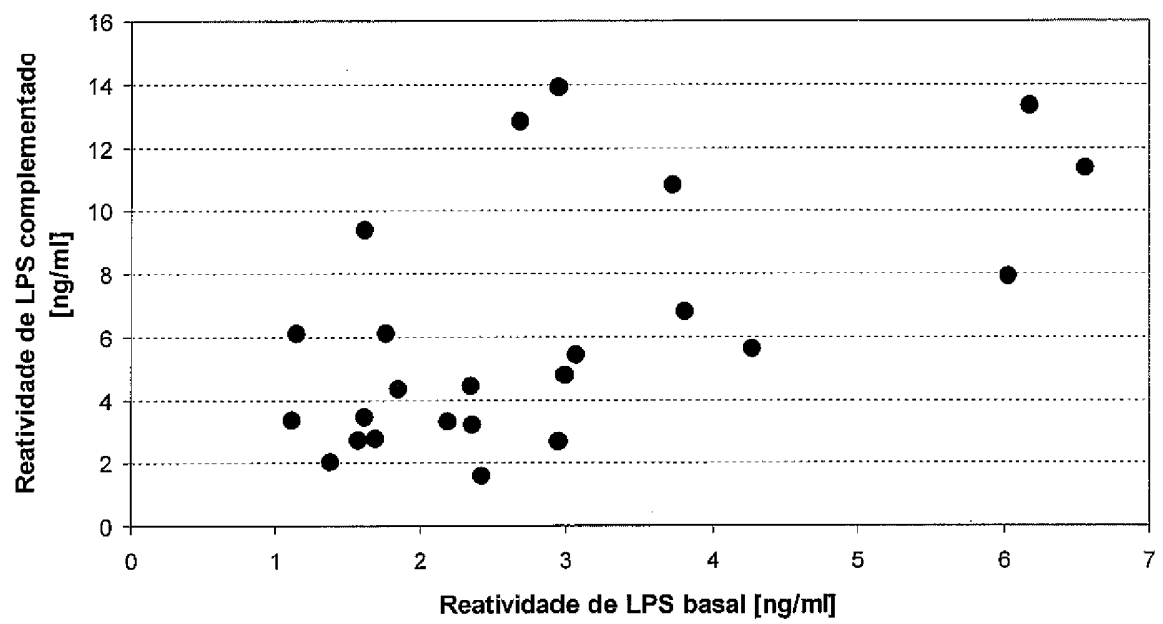


Figura 19

Fig. 20

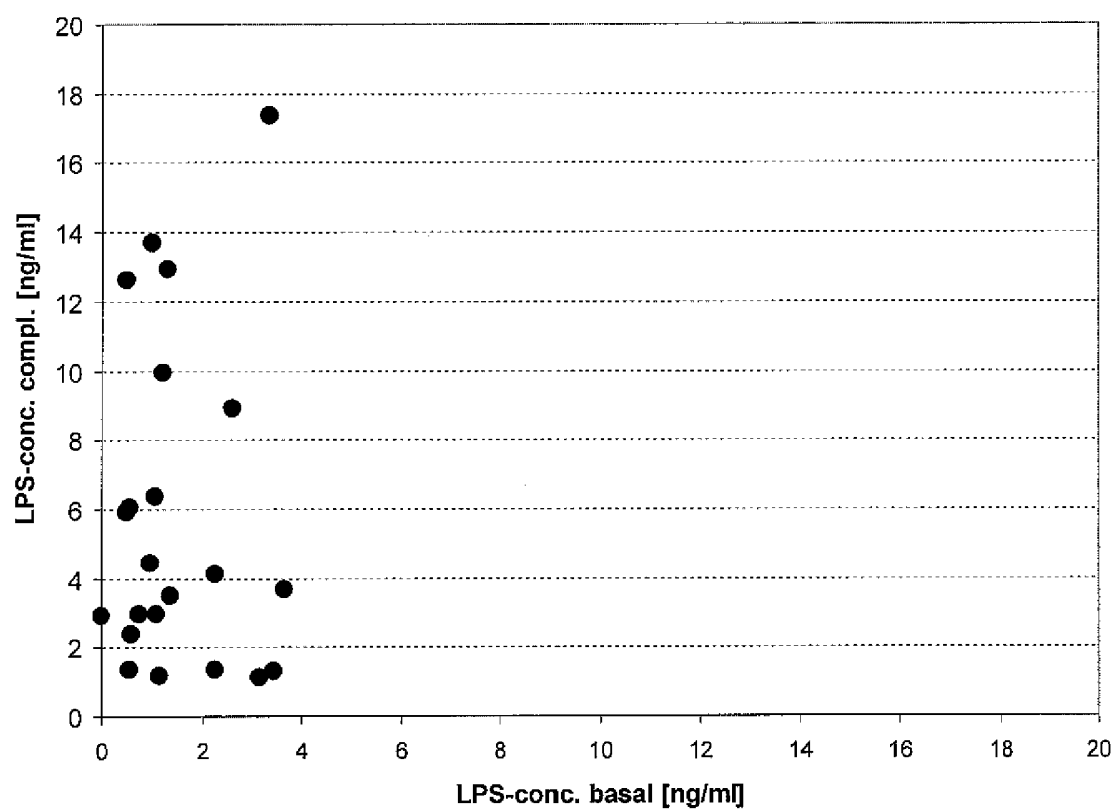


Figure 20

Fig. 21

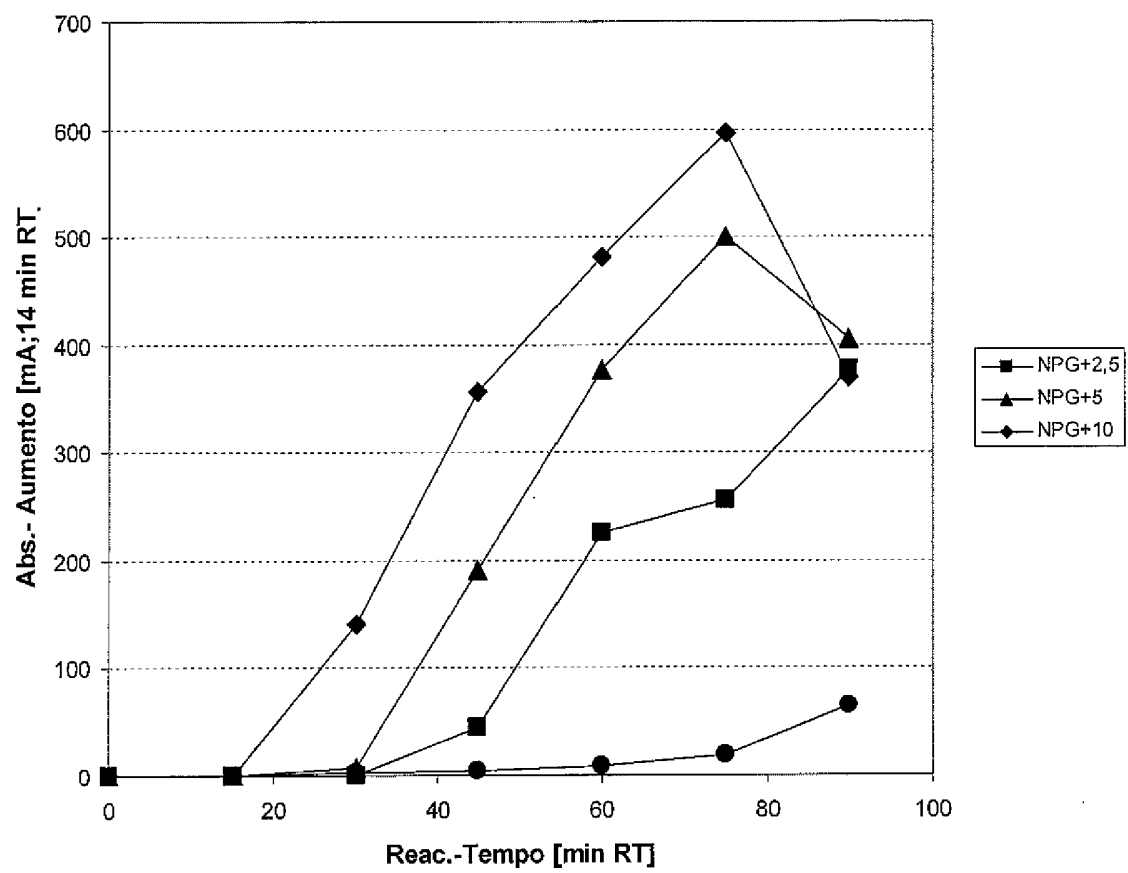


Figura 21

Fig. 22

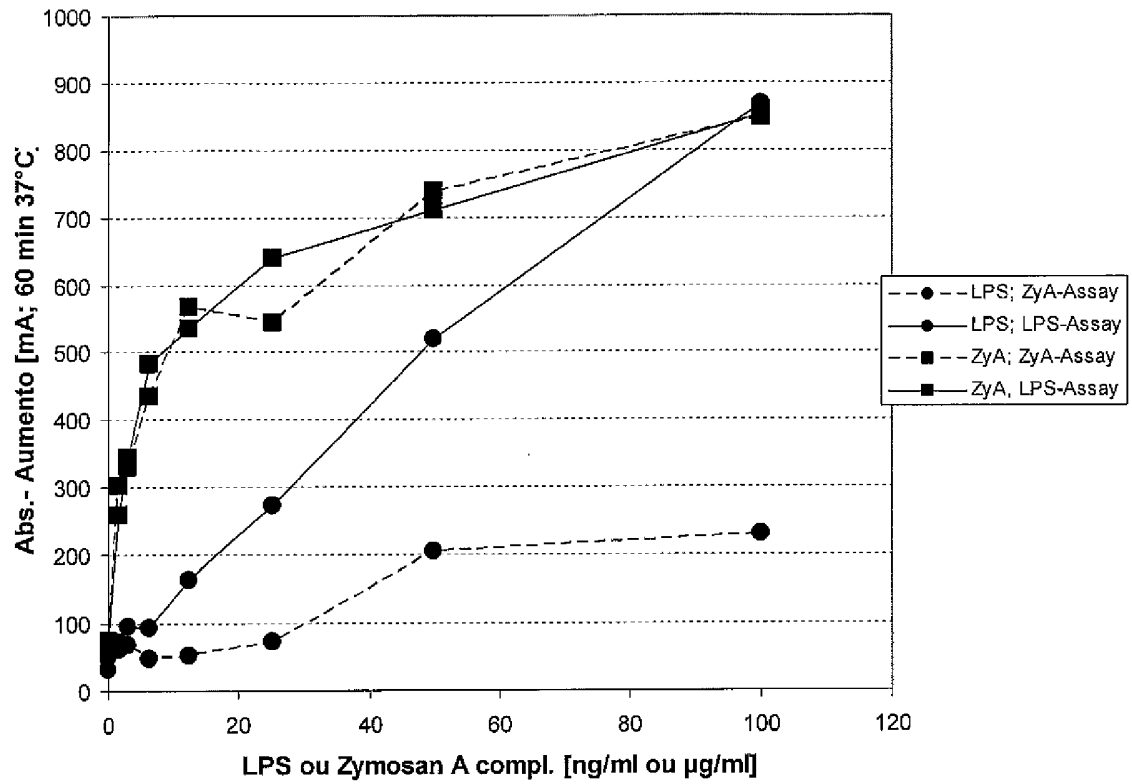


Figura 22

Fig. 23a

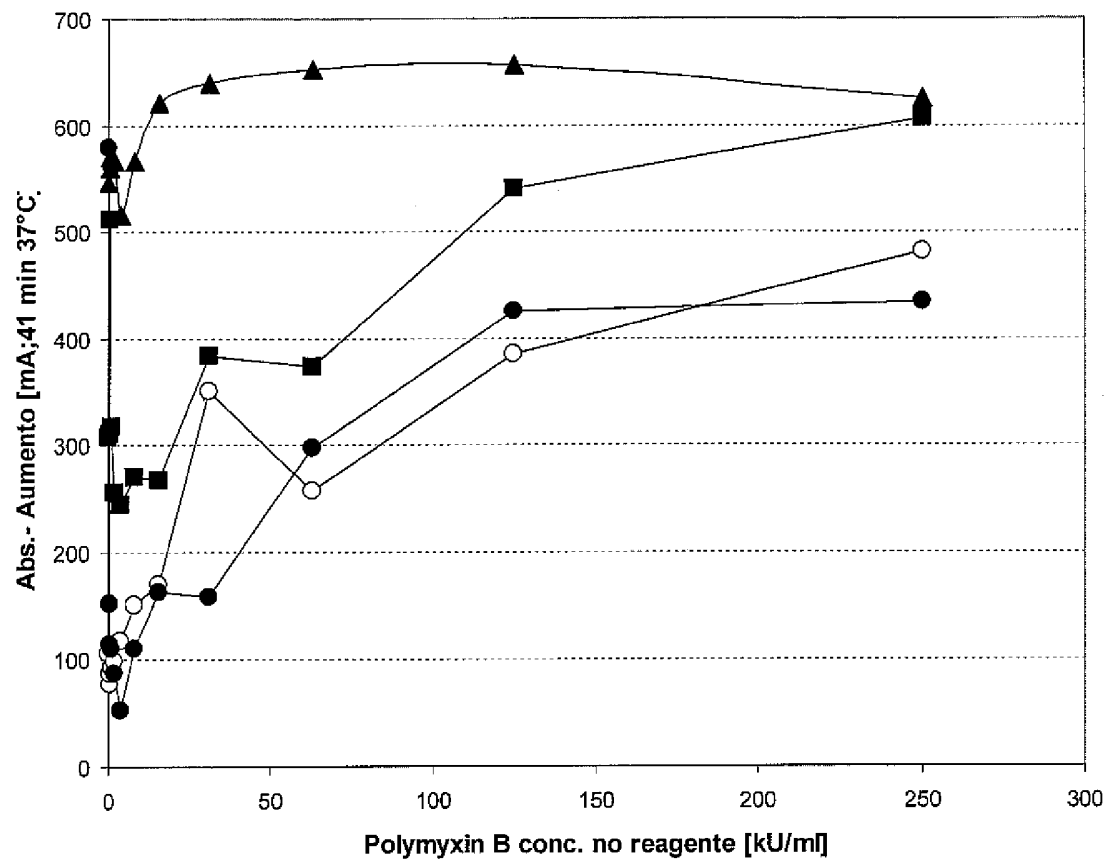


Figura 23a

Fig. 23b

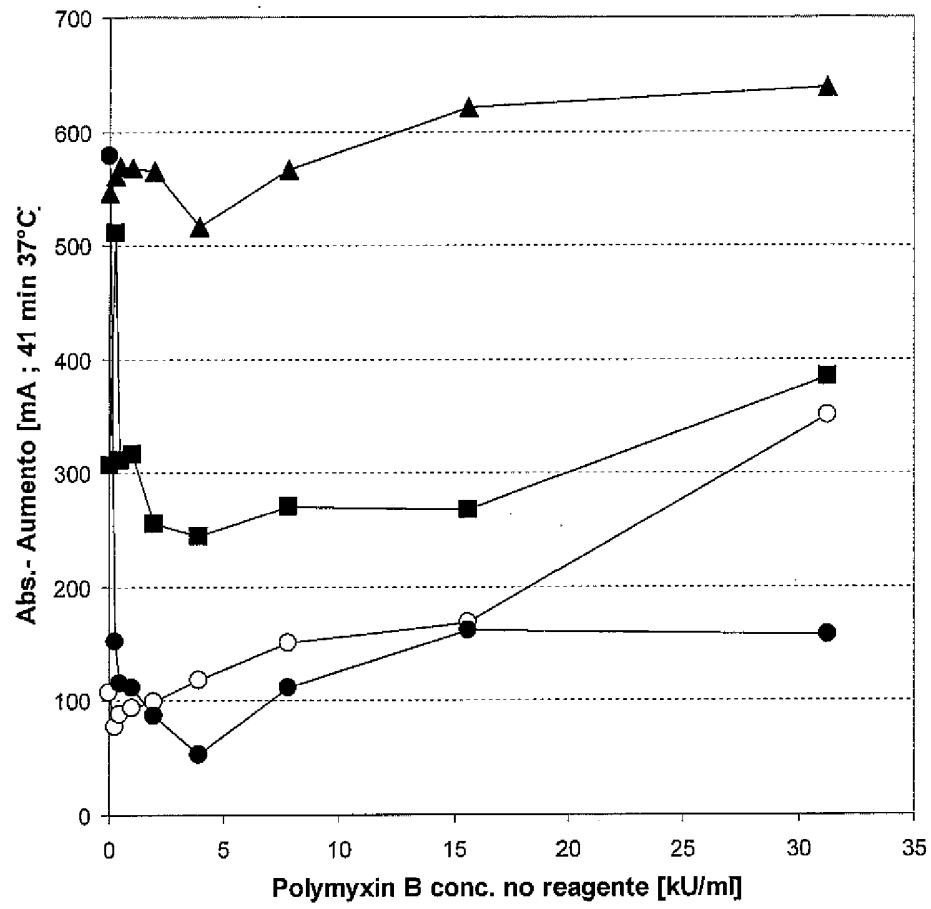


Figura 23b

Fig. 23c

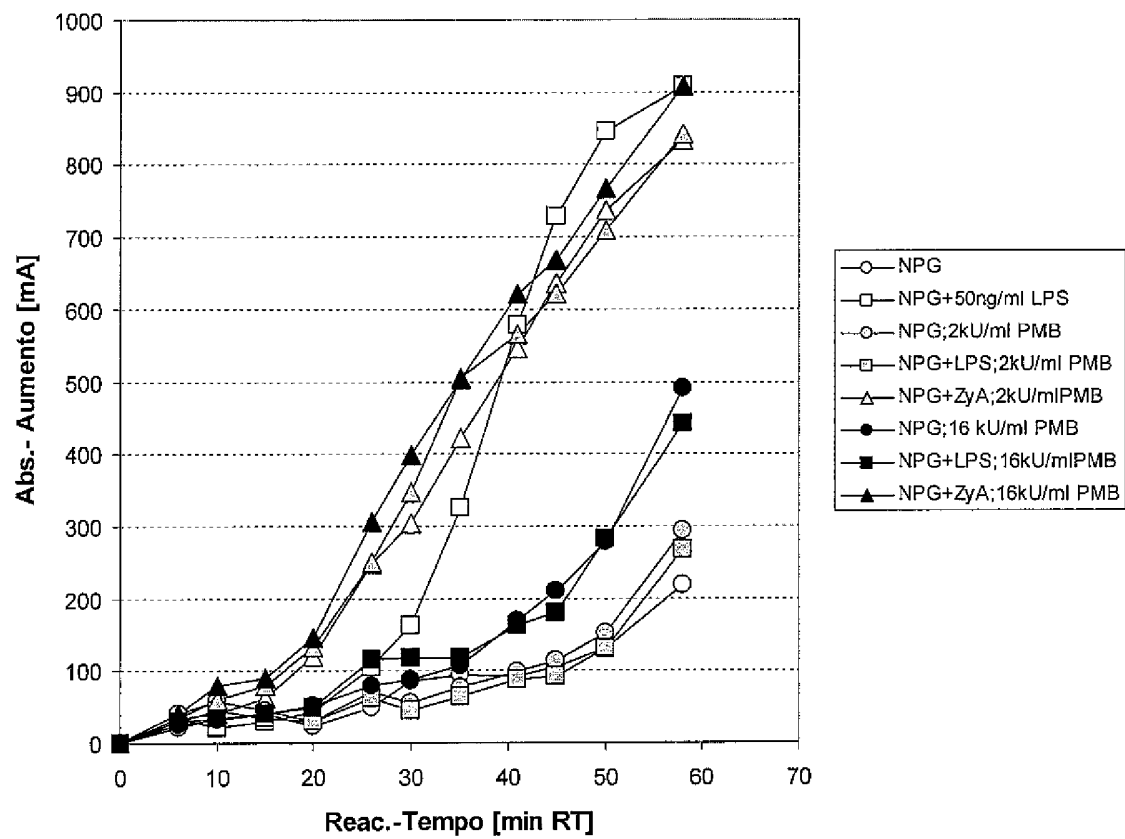


Figura 23c

Fig. 24a

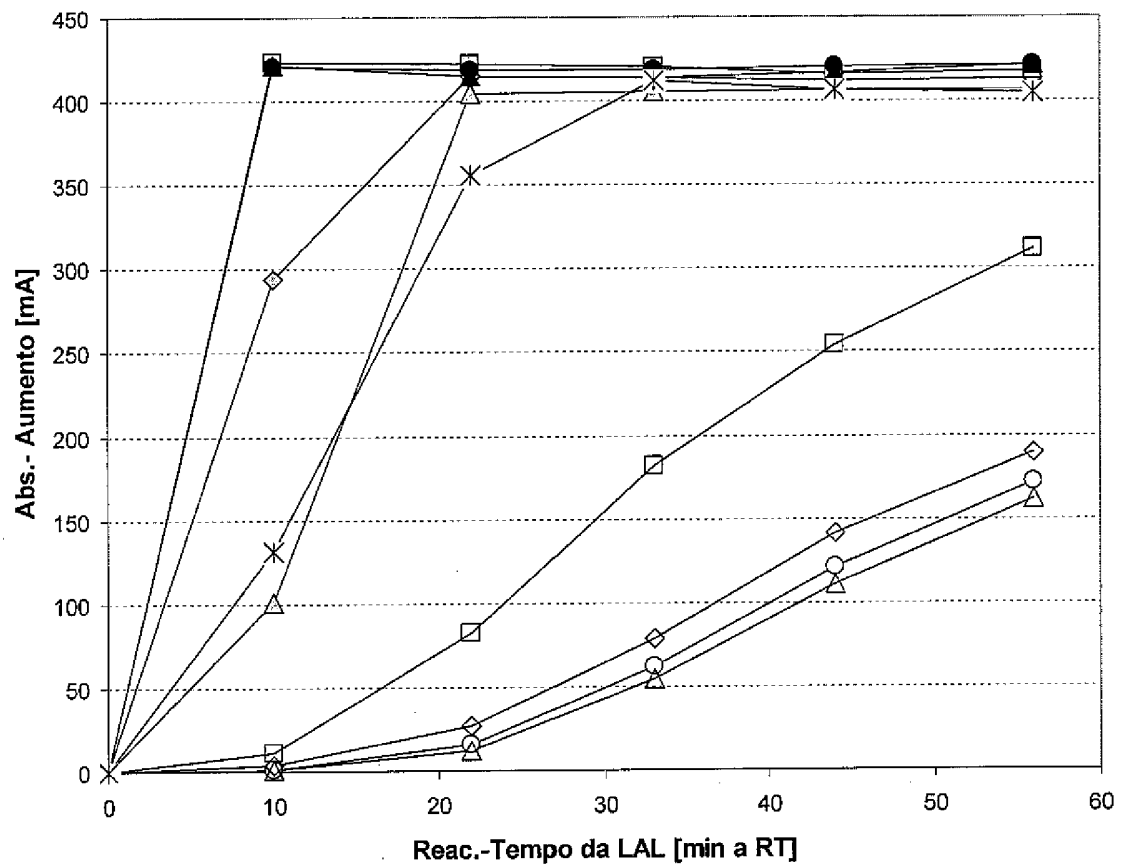


Figura 24a

Fig. 24b

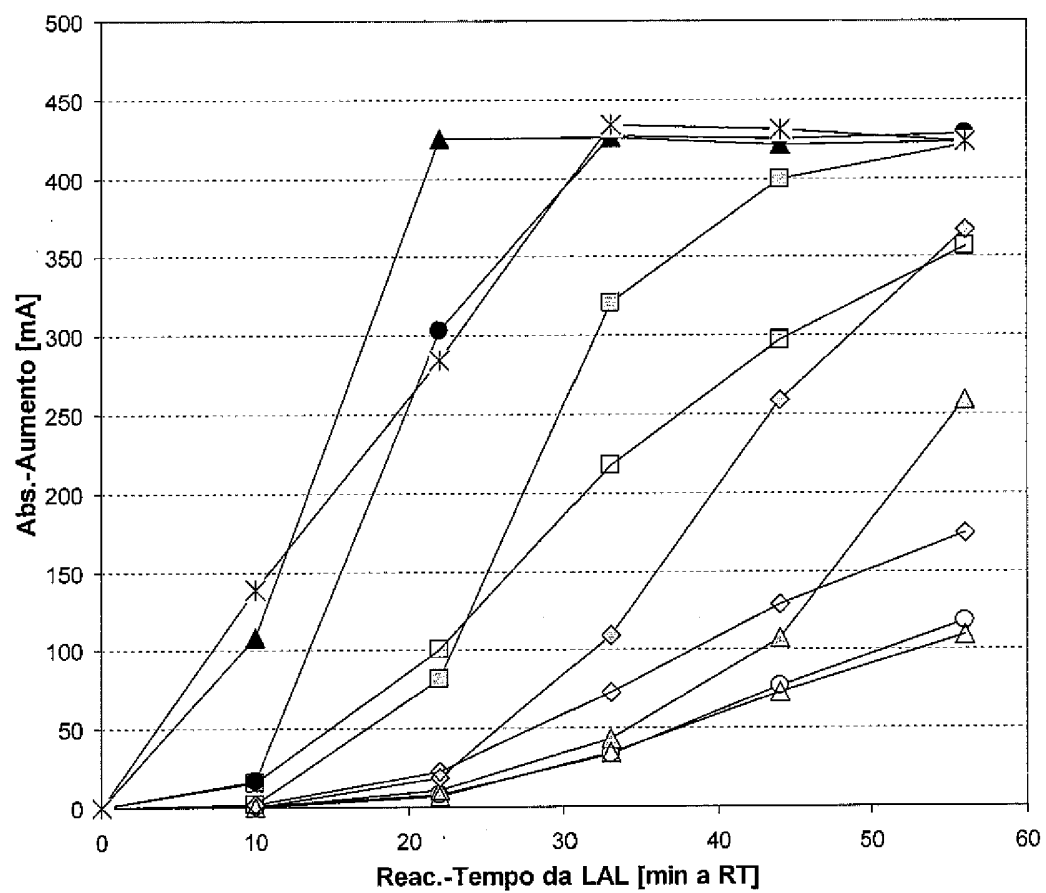


Figura 24b

Fig. 24c

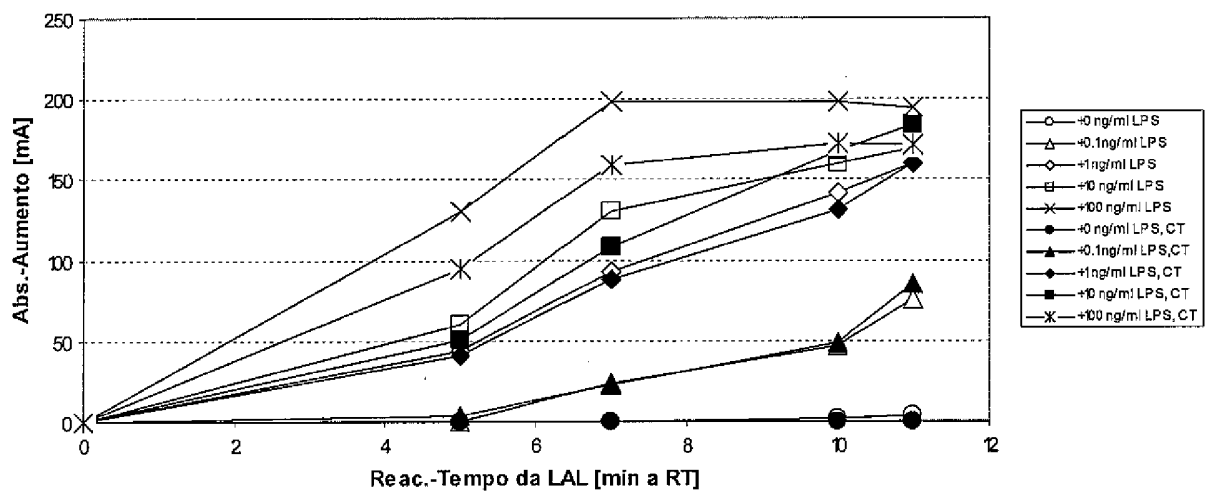


Figura 24c

Fig. 24d

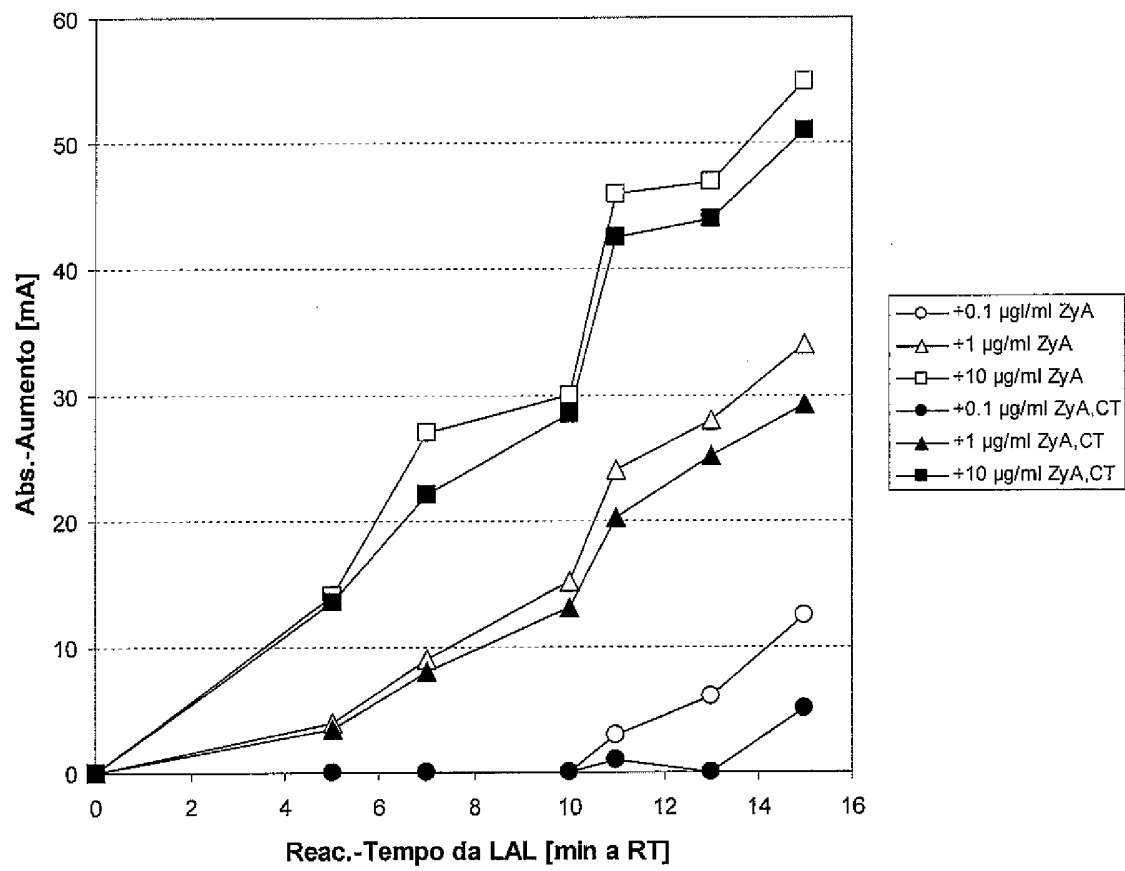


Figure 24d