

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

| | |
|--|---|
| (22) Data de pedido: 2004.08.16 | (73) Titular(es): UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA 3802 SPECTRUM BLVD., SUITE 100 TAMPA, FL 33612-9220 US |
| (30) Prioridade(s): 2003.08.15 US 604779 2004.01.14 US 481892 P | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2009.09.23 | (72) Inventor(es): MATT EWERT US PHIL AMUSO US ANDREW CANNONS US |
| (45) Data e BPI da concessão: 2011.05.25 141/2011 | (74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT |

(54) Epígrafe: **MATERIAIS E MÉTODOS PARA A CAPTURA DE PATOGÉNIOS E A REMOÇÃO DE ÁCIDO AURINTRICARBOXÍLICO DE UMA AMOSTRA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS E MATERIAIS PARA A EXTRACÇÃO DE PATOGÉNIOS INFECCIOSOS DE UMA AMOSTRA, TAL COMO O SANGUE, COMPREENDENDO OS PASSOS DE CRIAÇÃO DE UM AGREGADO DE FIBRINA QUE CONFINA OS PATOGÉNIOS E A INTRODUÇÃO DE UM REAGENTE DE LISE DE FIBRINA PARA EXPOR OS PATOGÉNIOS PARA ANÁLISE. O REAGENTE DE LISE DE FIBRINA É PREFERIVELMENTE COMPOSTO POR PLASMINOGÉNIO E ESTREPTOQUINASE CONGELADOS EM RELAÇÃO COINCIDENTE ATÉ QUE O REAGENTE DE LISE DE FIBRINA SEJA NECESSÁRIO, PELO QUE A ESTREPTOQUINASE REAGE POR VIA ENZIMÁTICA COM O PLASMINOGÉNIO PARA FORMAR PLASMINA APÓS A DESCONGELAÇÃO. O PLASMINOGÉNIO É PREFERIVELMENTE SUSPENSO ANTES DA CONGELAÇÃO NUMA SOLUÇÃO SALINA AQUOSA, INCLUINDO NA₂CL E NA₃PO₄. A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM A MATERIAIS E MÉTODOS PARA A REMOÇÃO EFICIENTE DE ATA A PARTIR DE UMA AMOSTRA COMPREENDENDO UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO. OS MÉTODOS EM QUESTÃO PROPORCIONAM UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO SUFICIENTEMENTE LIVRE DE ATA DE MODO QUE PODEM SER REALIZADAS UMA REACÇÃO DE RT-PCR E OUTRAS REACÇÕES ENVOLVENDO TRANSCRIPTASE INVERSA.

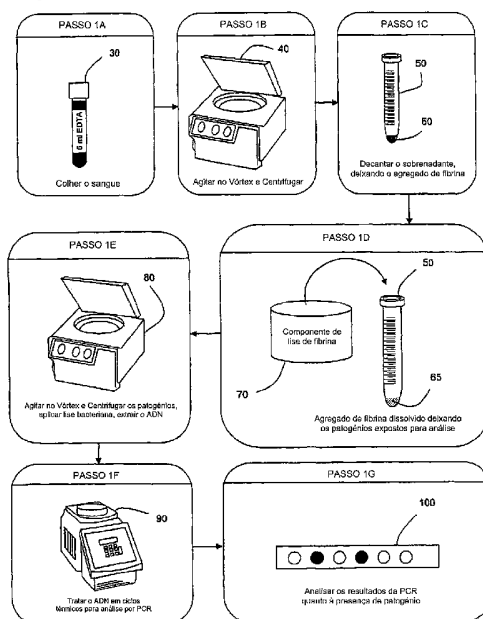
RESUMO

“Materiais e métodos para a captura de patógenos e a remoção de ácido aurintricarboxílico de uma amostra”

A presente invenção refere-se a métodos e materiais para a extracção de patógenos infecciosos de uma amostra, tal como o sangue, compreendendo os passos de criação de um agregado de fibrina que confina os patógenos e a introdução de um reagente de lise de fibrina para expor os patógenos para análise. O reagente de lise de fibrina é preferivelmente composto por plasminogénio e estreptoquinase congelados em relação coincidente até que o reagente de lise de fibrina seja necessário, pelo que a estreptoquinase reage por via enzimática com o plasminogénio para formar plasmina após a descongelação. O plasminogénio é preferivelmente suspenso antes da congelação numa solução salina aquosa, incluindo NaCl e Na₃PO₄.

A presente invenção refere-se também a materiais e métodos para a remoção eficiente de ATA a partir de uma amostra compreendendo uma composição de ácido nucleico. Os métodos em questão proporcionam uma composição de ácido nucleico suficientemente livre de ATA de modo que podem ser realizadas uma reacção de RT-PCR e outras reacções envolvendo transcriptase inversa.

Fig. 1



DESCRIÇÃO

"Materiais e métodos para a captura de patogénios e a remoção de ácido aurintricarboxílico de uma amostra"

ANTERIORIDADE DA INVENÇÃO

O ácido aurintricarboxílico (ATA) é um anião polimérico que tem sido demonstrado na literatura como sendo um potente inibidor de ribonuclease. O composto foi descrito como um aditivo para tampões de lise de amostras onde o objectivo é extrair espécies de ARN de amostras de tecidos. Tem-se mostrado que o extracto de ácido nucleico derivado de tais procedimentos é adequado para análises de hibridação e de electroforese em gel. No entanto, o ATA é um potente inibidor da transcriptase inversa, a qual é essencial para a detecção de espécies de ARN por reacção em cadeia pela polimerase (PCR). Os procedimentos publicados para remover ATA de composições contendo ácido nucleico têm girado em torno de procedimentos cromatográficos que eliminam ou retiram somente uma porção do ATA.

O uso de ATA num tampão de lise de uma proteinase K é potencialmente superior a 1) sais caotróficos (uma vez que estes tendem a reduzir a eficiência da hidrólise proteica guiada por proteinase K, tal como evidenciado pelos resultados de PCR); 2) inibidores de ribonuclease à base de proteína (uma vez que estes inibidores seriam partidos pela proteinase K); e 3) EDTA (o qual apenas inibe nucleases indirectamente através de quelação dos catiões bivalentes usados por aquelas nucleases). De facto, os catiões bivalentes têm que ser adicionados às preparações de ARN nas quais é conduzida a hidrólise enzimática do ADN. O que não foi demonstrado na arte anterior é um método onde, uma vez adicionado, pode ser conseguida a completa remoção de ATA a jusante de extractos de ácido nucleico até ao ponto em que vai funcionar a jusante a transcriptase inversa-PCR (RT-PCR).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, um método para a extracção de ácido nucleico a partir de uma amostra que contém ácido aurintricarboxílico (ATA), compreende o contacto da amostra com uma composição compreendendo ureia e dietilenotriaminopenta-acetato (DTPA). Este método proporciona uma composição de ácido nucleico suficientemente isenta de ATA para que possam ser realizadas uma reacção RT-PCR e outras reacções que envolvem transcriptase inversa.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma vista em diagrama do método divulgado.

A Figura 2 é uma vista em diagrama da preparação do reagente de lise de fibrina, de acordo com o Protocolo 1 adiante descrito.

A Figura 3 é uma tabela que fornece dados sobre o protocolo sanguíneo para o *Bacillus anthracis*.

A Figura 4 é uma tabela que fornece dados sobre uma comparação de duas amostras de sangue de diferentes indivíduos.

A Figura 5 é uma tabela que fornece dados sobre uma avaliação do presente método por um funcionário do laboratório do Departamento de Saúde.

A Figura 6 é uma tabela que fornece dados sobre o protocolo sanguíneo para *Yersinia pestis*.

A Figura 7 é uma vista em diagrama da preparação dos reagentes de extracção de acordo com o Protocolo 1 adiante descrito.

As Figuras 7-9 são vistas em diagrama da recuperação bacteriana e da lise de fibrina, de acordo com o Protocolo 1 adiante descrito.

As Figuras 10-13 são vistas em diagrama da lise bacteriana e da extracção de ácido nucleico de acordo com o Protocolo 1 adiante descrito.

A Figura 14a é uma vista em diagrama dos passos de extracção de reagentes de acordo com o Protocolo 2 adiante descrito.

A Figura 14b é uma vista em diagrama dos passos de extracção de reagentes de acordo com o Protocolo 2 adiante descrito.

A Figura 15 é uma vista em diagrama dos passos de extracção de reagentes de acordo com o Protocolo 3 adiante descrito.

A Figura 16a é uma vista em diagrama dos passos de extracção dos reagentes de acordo com o Protocolo 4 adiante descrito.

A Figura 16b é uma vista em diagrama dos passos de extracção dos reagentes de acordo com o Protocolo 4 adiante descrito.

A Figura 17 é uma tabela que fornece dados sobre os pontos de cruzamento das bandas de ruído para amostras de sangue com *B. anthracis* adicionado ("spiked") e processadas com plasminogénio, estreptoquinase, fosfolipase A₂, ADNase I e lipase com centrifugação ou filtração.

A Figura 18 mostra a sedimentação e a solubilização de agregados de tecido a partir de amostras de sangue de 6 ml expostas a vários tratamentos com detergente e enzimas.

A Figura 19 mostra as características de filtração de amostras de sangue de 6 ml expostas a vários tratamentos com detergente e enzimas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

São adicionalmente descritos métodos de extracção de patogénios infecciosos de uma amostra biológica tal como um volume de sangue e inclui os passos de criação de um agregado

de fibrina que confina os patogénios e a introdução de um reagente de lise de fibrina para expor os patogénios para análise e ADNase para facilitar a extracção do ADN. Os reagentes de lise de fibrina podem ser compostos por ADNase, plasminogénio e estreptoquinase congelados em relação coincidente até que o reagente de lise de fibrina seja necessário, pelo que a estreptoquinase reage por via enzimática com o plasminogénio para formar plasmina após a descongelação e a introdução na amostra de fibrina. O plasminogénio é preferivelmente suspenso antes da congelação numa solução salina aquosa, incluindo NaCl e Na₃PO₄. O reagente de lise de fibrina é preferivelmente composto por ADNase e Fosfolipase A₂. A enzima ADNase é usada para facilitar a ruptura física e química dos elementos sanguíneos sedimentados que resultam do protocolo anteriormente descrito. A Fosfolipase A₂ é utilizada para ajudar a digestão de ADN humano por destruição das bicamadas fosfolipídicas e, conseqüentemente, pela destruição da membrana nuclear.

A presente divulgação utiliza a ressuspensão das enzimas secas numa solução tampão usando fosfato de potássio como uma ajuda para a solubilização dos elementos sanguíneos. É imperativo que a estreptoquinase e o plasminogénio não sejam misturados com a solução tampão até ao momento imediatamente anterior à adição da amostra de sangue. O intervalo de pH do fosfato de potássio é de cerca de 7,8 a 8,0, o qual é diferente da arte anterior, que reivindica um intervalo eficaz de pH de 7,2 a 7,6. A arte anterior usa soluções de ião fosfato com pH inferior para actuarem como um verdadeiro tampão; o método presente permite, no entanto, actividade da Fosfolipase A₂ e solubilidade do Magnésio óptimas. O magnésio está presente na solução tampão na forma do catião bivalente que acciona a actividade da Fosfolipase A₂, na presença de ADNase. A arte anterior utiliza cálcio na forma do catião bivalente clássico para accionar a actividade da Fosfolipase A₂, no entanto, o cálcio não é compatível com os iões fosfato essenciais para a solubilização dos elementos sanguíneos.

Uma concretização da presente divulgação inclui a concentração e a extracção de partículas tais como priões, toxinas, marcadores metabólicos, matéria cancerosa, marcadores

de estado de doença, bactérias, vírus e fungos, a partir de um volume de sangue, através da introdução de uma combinação enzima-detergente para expor os patogénios na amostra de sangue, e a análise da amostra de sangue relativamente às partículas agora facilmente identificáveis através da extracção. A enzima-detergente pode ser um reagente de lise de fibrina compreendendo plasminogénio e estreptoquinase. O plasminogénio e a estreptoquinase podem ser congelados em relação coincidente até o reagente de lise de fibrina ser necessário. A estreptoquinase reage então com o plasminogénio para formar plasmina após a descongelação. O plasminogénio pode ser suspenso numa solução salina aquosa antes da congelação. As soluções salinas adequadas podem incluir NaCl, NaPO₄ ou semelhantes. Para melhorar a análise, as partículas podem ser replicadas através de reacções em cadeia pela polimerase (PCR).

Com a introdução de ADNase, o processo é facilitado pela conversão de ADN em fragmentos curtos, contribuindo assim para um processo de hidrólise de proteínas mais rápido e eficiente durante a extracção de ADN e para a diminuição da carga de ADN humano inibitório. Do mesmo modo, a introdução de endonuclease produz uma vantagem semelhante.

Como alternativa à congelação, a enzima-detergente pode incluir estreptoquinase seca e plasminogénio seco como reagentes de lise de fibrina. Os reagentes secos podem então ser misturados e distribuídos em recipientes de teste descartáveis. Esta concretização pode ser particularmente útil para ensaios de campo em locais onde estão indisponíveis equipamento de laboratório sofisticado e controlos.

O plasminogénio pode ser combinado com Fosfolipase A₂, ADNase, Endonuclease, Lipase e suas combinações. A combinação seca enzima-detergente pode ser suspensa em peletes de tampão de trealose e acondicionada em tubos na forma de um reagente seco. Os reagentes secos podem então ser ressuspensos num tampão, adicionados a um volume de 1-10 ml de sangue e incubados durante cerca de 5-20 minutos à temperatura ambiente. Mais especificamente, o reagente seco é composto por cerca de 1500-4500 KU de Fosfolipase A₂, cerca de 5000-10 000 U de Estreptoquinase, cerca de 2-10 U de Plasminogénio,

cerca de 200-3650 U de ADNase, cerca de 200-4000 U de Endonuclease e cerca de 10 000-100 000 de Lipase.

A solução pode ser centrifugada durante aproximadamente 20 minutos a 5000-5500 x g, a uma temperatura de 10-20°C, o sobrenadante decantado e a pelete lavada. A pelete pode ser lavada três vezes com uma solução de Ecotina 10-20 mM / HEPES 20 mM com pH 7,7 e/ou uma solução de sacarose 10-20 mM / HEPES 20 mM com pH 7,7. A amostra resultante pode então ser aplicada a um método de extracção de ácido nucleico comercialmente disponível.

A digestão da amostra pode incluir lise e inactivação com ADNase ou lise e inactivação com endonuclease. Podem ser utilizados 12,5-25 mg de proteinase K, SDS (dodecilsulfato de sódio) a 1-10%, ácido aurintricarboxílico 10-200 mM e tampão citrato de sódio 10-20 mM com pH 7,8-8,4, permitindo-se incubar a solução à temperatura ambiente durante 10 minutos. A amostra pode então ser filtrada com uma unidade de filtração de 0,22-0,45 µm, lavada com Ácido Aurintricarboxílico 10-200 mM, digerida com lise e inactivação com ADNase e/ou inactivação com Endonuclease e purificada.

A digestão da amostra pode incluir os passos de combinar 12,5-25 mg de proteinase K, SDS a 1-1,5%, ácido aurintricarboxílico 10-200 mM e tampão citrato de sódio 10-20 mM, incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos e eluir o lisado da superfície do filtro por adição de isotiocianato de guanidina 3,5-4,2 M com pH 6,4.

As soluções podem ser aplicadas directamente num dispositivo biossensor em que, em resposta à presença dos patogénios na amostra de sangue, o paciente desenvolve marcadores de estado de doença nativos ou patogénicos que permitem a captura e a detecção destes marcadores pelo dispositivo biossensor. Alternativamente, a solução pode ser aplicada directamente a um dispositivo de cromatografia líquida com espectrometria de massa pelo que, em resposta à presença dos patogénios na amostra de sangue, o paciente desenvolve marcadores de estado de doença nativos ou patogénicos que permitem a detecção de assinaturas de massa

associadas aos componentes estruturais dos patogénios utilizando o dispositivo de espectrometria de massa.

O tampão pode compreender detergente e sais. Isto pode ser conseguido ajudando a solubilização dos elementos sanguíneos introduzindo fosfato de potássio 10-30 mM num intervalo de pH de 7,8 a 8,0, conduzindo a actividade da Fosfolipase A2 por adição de cloreto de magnésio 10-80 mM como o catião bivalente, acrescentando Cloreto de Sódio 20-150 mM e incluindo Ácido Aurintricarboxílico 10-200 mM durante o processo de incubação com ADNase. O tampão pode também incluir Triton X-100 a 1,0-1,2%. Os passos adicionais podem incluir combinar metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo 20-35 mM e Saponina a 0,05-0,1%; e armazenar as enzimas utilizando um tampão de trealose. A armazenagem das enzimas é conseguida por meio de um tampão de trealose em combinação com o metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo. O tampão de armazenagem de trealose compreende tampão fosfato de potássio 10 mM, Triton X-100 a 0,01-0,04%, Ditiotreitól 1-5 mM e Trealose 0,3-0,5 M.

Na Figura 1, é realizada uma colheita de sangue **30** a um paciente. É adicionada uma solução de PBS, pH 7,4, e Triton X-100 a 1,2%, o sangue é agitado no vórtex e centrifugado **40** criando a pelete **60** num tubo de 15 ml **50**. Preferivelmente podem ser adicionados resinas, hidróxidos de metais e/ou nano-materiais com a solução de PBS/Triton X-100 para capturar partículas tais como bactérias, vírus, fungos, células cancerosas, priões, toxinas e semelhantes, para contribuir com uma maior densidade para estas partículas. O aumento na densidade das partículas permite velocidades inferiores durante a centrifugação.

O sobrenadante é decantado deixando um agregado de fibrina. Um reagente de lise de fibrina **70** da invenção é adicionado ao tubo **50** que dissolve o agregado de fibrina e deixa os patogénios **65** expostos para análise. Os patogénios **65** são agitados no vórtex, centrifugados e sujeitos a lise para extrair o ADN dos patogénios. O ADN é então replicado **90** e analisado **100** quanto à identidade do patogénio suspeito.

Divulga-se um dispositivo utilizado para evitar a necessidade de uma centrífuga. O dispositivo utilizará eléctrodos flexíveis semelhantes a uma brânquia de peixe para recolher partículas (tais como bactérias, vírus, células cancerosas, priões ou toxinas). Os eléctrodos também serão usados para recolher resinas e nano-materiais que têm estas partículas a eles associados. O dispositivo assemelhar-se-á a uma bolha numa superfície. Será utilizado um potencial eléctrico para acelerar a captura de patogénios. O dispositivo pode ser comprimido para permitir a eficiente remoção dos conteúdos. O dispositivo teria preferivelmente as seguintes propriedades: (1) uma camada de base rígida e uma camada superior flexível; (2) "brânquias" flexíveis para serem montadas nas camadas superior ou inferior; (3) cadeias de estreptavidina e ácido hialurónico funcionalizadas com péptidos bioactivos, anticorpos, aptâmeros, polímeros impressos molecularmente ("molecular imprinted polymers"), ou metais que atraem partículas, tais como bactérias, vírus, fungos, toxinas, marcadores metabólicos, marcadores de estado de doença ou agentes químicos para serem depositados nos eléctrodos de "brânquias" flexíveis; (4) a camada flexível terá eléctrodos depositados sobre si; (5) contra-eléctrodos os eléctrodos de "brânquias" residirão no lado oposto; (6) a média de volume morto do dispositivo é de 300 microlitros - é preferível que não haja material residual no dispositivo depois de espremer o material para fora do dispositivo; e (7) a poliimida formará a porção flexível e os eléctrodos serão feitos de Pt, Au ou de carbono. O dispositivo é preferivelmente utilizado da seguinte maneira: (1) fazer correr líquido para o dispositivo e aplicar tensão nesse momento; (2) adicionar produtos químicos e aquecer o dispositivo; e (3) espremer o dispositivo para remover todos os conteúdos. O dispositivo é utilizado para preparar uma amostra para análise de partículas (tais como bactérias, vírus, células cancerosas, priões ou toxinas) utilizando espectrofotometria, espectroscopia de massa, anticorpos, cultura ou sistemas de detecção baseados no ácido nucleico (e.g. PCR, NASBA, TMA).

Pode ser usado um dispositivo de filtração para filtrar as partículas de sangue tratado com as soluções de Triton X-100/PBS/magnésio com enzimas seleccionadas a partir do grupo

de estreptoquinase, plasminogénio, fosfolipase A₂, ADNase e lipase. Pode também ser usado um dispositivo de filtração para filtrar as partículas de sangue tratado com uma combinação de metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glicopiranosido, saponina e PBS / magnésio mais enzimas seleccionadas a partir do grupo de estreptoquinase, plasminogénio, fosfolipase A₂, ADNase e lipase. Depois da lavagem dos reagentes de tratamento enzima e detergente e de quaisquer componentes sanguíneos quebrados residuais, a partícula está pronta para análise ou processamento posterior.

A preparação de uma concretização de um reagente de lise de fibrina é mostrada como Protocolo 1 na Figura 2 onde o NaCl, o MnCl, o DTT, a ADNase e o plasminogénio são adicionados ao tubo de mistura **110**. É então adicionado fosfato de sódio ao tubo de mistura **110** e a solução é distribuída por tubos de reagente de 1,5 ml **120** colocados em gelo. Os tubos de reagente **120** são congelados a -75°C durante aproximadamente 20 minutos. Adicionam-se cerca de 2700 U de estreptoquinase **130** à parede dos tubos de reagente **120** um pouco acima da solução de plasminogénio congelada.

As Figuras 3-6 fornecem os resultados de PCR provenientes de ensaios com amostras de sangue semeadas com *Bacillus anthracis* não virulento vegetativo encapsulado, crescidas de acordo com o protocolo CDC # CDC.DFA.1.2, armazenadas em glicerol TSB a 15% e congeladas a -75°C. Reservas de *Yersinia pestis* não virulentas crescidas em TSB a 37°C, armazenadas em glicerol TSB a 15% e congeladas a -75°C. As contagens bacterianas foram testadas no momento da colheita e novamente testadas no momento da inoculação da amostra.

Os dados relativos à média de UFC de *Bacillus anthracis* por seis ml de sangue humano são derivados de ensaios após congelação tendo em conta o grande desvio padrão encontrado em eventos de diluição após congelação justapostos. Não é reconhecida ou esperada morte celular significativa. A taxa de morte celular de 30% é a mais elevada que é razoavelmente esperada nas piores circunstâncias. Uma abordagem conservadora seria aumentar todas as UFC calculadas de *Bacillus anthracis* em 30%.

Os dados relativos à média de UFC de *Yersinia pestis* por seis ml de sangue são derivados de ensaios pré-congelação. O baixo desvio padrão dos replicados das contagens de pré-congelação e a concordância com os ensaios de pós-congelação permitem a utilização dos números da contagem bacteriana pré-congelação. Esta é uma abordagem conservadora que pode ser utilizada tendo em conta os resultados agora previsíveis que são derivados do armazenamento e diluição deste organismo.

A presente divulgação é de um método que gera ADN analítico de modo reprodutível adequado para o ensaio por PCR de patogénios, tais como o *Bacillus anthracis*, utilizando amostras de sangue de pacientes que tenham até 3 meses de idade. A sensibilidade é de 100% para <10 UFC/ml de sangue humano quando se utilizam 6 ml de sangue recolhido num Becton Dickinson Vacutainer (Tabelas 1 e 2). Este protocolo também permite a detecção de *Yersinia pestis* com 100% de sensibilidade para <10 UFC/ml para pelo menos um dos quatro conjuntos de oligos de acordo com os dados mais limitados recolhidos para este organismo (Tabela 3). Deve notar-se que o CDC não considera amostras positivas para *Y. pestis* salvo se dois conjuntos de oligos produzirem um sinal aceitável para PCR.

Em conformidade com o Protocolo 1, a Figura 7 mostra um método preferido para a preparação dos reagentes de extracção de acordo com a invenção. As Figuras 8-9 mostram um método de recuperação bacteriana e lise de fibrina, de acordo com a invenção. As Figuras 10-13 mostram um método preferido de lise bacteriana e extracção de ácidos nucleicos de acordo com a invenção.

Numa concretização alternativa, como é mostrado nas Figuras 14-16b, as enzimas individuais de plasminogénio e estreptoquinase são transformadas em pó seco, misturadas e em seguida distribuídas por tubos descartáveis. Noutra concretização, a Fosfolipase A₂, o plasminogénio, a ADNase ou a endonuclease e a lipase são suspensas e secas em peletes de tampão de trealose. Embora seja preferida a Fosfolipase A₂, também pode ser usada qualquer enzima que destrua a membrana nuclear, mantendo a parede celular bacteriana ou as cápsulas virais intactas. A estreptoquinase é igualmente suspensa e

seca em peletes de tampão de trealose. Pelo menos uma pelete do plasminogénio e uma pelete da estreptoquinase são acondicionados em tubos na forma de reagentes secos.

Os reagentes secos aqui divulgados podem ser ressuspensos em 10 ml de uma solução tampão compreendendo fosfato de potássio cerca de 10-30 mM, cloreto de magnésio cerca de 10-80 mM, cloreto de sódio cerca de 20-150 mM, Ácido Aurintricarboxílico cerca de 10-200 mM e Triton X-100 a cerca de 1,0-1,2%. O Ácido Aurintricarboxílico é evidenciado para proporcionar um nível de protecção ao ácido nucleico bacteriano sem impedir a digestão do ADN humano. O uso de Ácido Aurintricarboxílico não é descrito nos métodos anteriores de digestão de ADN humano. O metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo e a saponina podem ser substituídos por Triton X-100. Numa concretização, o metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo é utilizado numa concentração de 20-35 mM e a saponina é utilizada na concentração 0,05-0,19. O metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo é armazenado com a fosfolipase A₂, o plasminogénio, a ADNase I e a lipase num tampão de armazenagem de Trealose. A substituição do Triton X-100 por metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo e solução de saponina permite a actividade eficiente da Fosfolipase A₂, proporciona a acção de quebrar agregados proteicos sem desnaturação, e é mais genial para as paredes bacterianas do que o Triton X-100. O uso de saponina e metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo nesta combinação não é descrito na arte anterior. O tampão de armazenagem de Trealose pode incluir fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4, Triton X-100 a 0,01-0,04% ou metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosídeo, ditiotreitol 1-5 mM e Trealose 0,3-0,5. A mistura de tampão e enzima é então imediatamente combinada com 10 ml de amostra de sangue, que pode ser reduzida para 1 ml. A amostra é então incubada à temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Os componentes supracitados ajudam a solubilização dos elementos sanguíneos através da minimização de certas partículas que, de outra forma, entupiriam os filtros, prejudicariam os dispositivos biossensores ou de espectrometria de massa e impediriam a extracção de ácidos nucleicos. A solubilização ocorre enquanto o ADN humano é eficientemente digerido e o ADN viral e/ou bacteriano permanecem intactos.

Em conformidade com os Protocolos 2 e 4, uma combinação preferida de enzimas é constituída por Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease, Fosfolipase A₂ e Lipase. Alternativamente, também podem ser usadas combinações de enzimas compreendendo Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease e Fosfolipase A₂. Noutra combinação alternativa podem ser usadas Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease assim como ADNase ou Endonuclease, Fosfolipase A₂ e Lipase. A ADNase ou a Endonuclease em combinação com a Fosfolipase A₂ é ainda uma outra alternativa. A eficácia das três últimas combinações revelou-se igual.

Em conformidade com o Protocolo 3, uma combinação preferida de enzimas é constituída por Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease, Fosfolipase A₂ e Lipase. Alternativamente, também podem ser usadas combinações de enzimas compreendendo Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease e Fosfolipase A₂. Noutra combinação alternativa, pode ser usada Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease.

Como é mostrado na Figura 14 com o Protocolo 2, a amostra é centrifugada por um período de cerca de 20 minutos a 5000-5500 x g, a uma temperatura entre 10-22°C, após a incubação. O sobrenadante é então decantado e, em seguida, a pelete é lavada três vezes com uma solução de Ecotina 10-20 mM / HEPES 20 mM com pH 7,7 e/ou uma solução de Sacarose 20-30 mM / HEPES 20 mM com pH 7,7.

Alternativamente, após a incubação, a amostra do Protocolo 2 é centrifugada de maneira semelhante e o sobrenadante é decantado, seguido pela lise da amostra e inactivação com ADNase ou Endonuclease usando cerca de 12,5-25 mg de proteinase K, dodecilsulfato de sódio (SDS) a cerca de 1-1,5%, Ácido Aurintricarboxílico a cerca de 10-200 mM e tampão citrato de sódio a cerca de 10-20 mM com pH 7,8-8,4. Deixa-se a amostra incubar à temperatura ambiente durante cerca de 10 minutos. A amostra digerida pode então ser aplicada a qualquer método de extracção de ácido nucleico comercialmente disponível, mostrado na Figura 14b.

No entanto, noutra alternativa, referida como Protocolo 3 e ilustrada na Figura 15, a amostra é filtrada com uma unidade de filtração de 0,22-0,45 μm e lavada com 10-20 ml de Ácido Aurintricarboxílico a cerca de 10-200 mM, seguida pela lise da amostra e inactivação com ADNase ou Endonuclease. A lise da amostra e a inactivação com ADNase ou Endonuclease são realizadas utilizando cerca de 12,5-25 mg de proteinase K, SDS a cerca de 1-1,5%, Ácido Aurintricarboxílico a cerca de 10-200 mM, e tampão citrato de sódio a cerca de 10-20 mM. A amostra é então incubada à temperatura ambiente durante cerca de 10 minutos. É necessária a adição de isotiocianato de guanidina a cerca de 3,5-4,2 M, pH 6,4, para eluir o lisado da superfície do filtro. O extracto de ácido nucleico pode então ser adicionalmente purificado utilizando um método disponível comercialmente.

Outra alternativa, referida como Protocolo 4 e ilustrada na Figura 16a, aplica a amostra directamente num dispositivo biossensor que irá capturar e detectar as bactérias, vírus, fungos, toxinas, príões, agentes químicos, marcadores metabólicos ou marcadores de estado de doença nativos desenvolvidos pelo próprio corpo do paciente, em resposta a estes patogénios e a agentes presentes na amostra de sangue.

Ainda noutro Protocolo 4 alternativo, mostrado na Figura 16b, a amostra é aplicada directamente num dispositivo de cromatografia líquida com espectrometria de massa que irá detectar as assinaturas mássicas dos componentes estruturais que constituem as bactérias, os vírus, as toxinas, os príões e os agentes químicos presentes na amostra de sangue ou os marcadores de estado de doença nativos desenvolvidos pelo próprio corpo do paciente, em resposta a estes patogénios e a agentes presentes na amostra de sangue. Observar-se-á que os objectos acima apresentados, e os que se tornam evidentes a partir da descrição anterior, são eficientemente atingidos e, como podem ser feitas determinadas alterações na construção anterior sem desvio ao âmbito da invenção, pretende-se que todas as matérias contidas na descrição anterior ou mostradas nos desenhos anexos sejam interpretadas como ilustrativas e não num sentido limitativo.

A presente invenção refere-se a métodos que podem ser utilizados para a remoção selectiva de ATA de uma amostra tal como uma amostra de sangue contendo ácido nucleico. Tipicamente, o ATA é usado em procedimentos de extracção e purificação do ARN de células, vírus, etc., devido à sua actividade como um inibidor da ribonuclease. Numa concretização da invenção reivindicada, o potente inibidor da ribonuclease ATA estará presente durante a parte do processo de extracção de ácido nucleico onde se deixa prosseguir a hidrólise de proteínas em condições ideais (*i.e.*, com ATA e sais não caotrópicos, tais como o tiocianato de guanidina). As composições para a remoção de ATA podem ser proporcionadas tanto na forma de solução como na forma de sólido seco. Preferivelmente, as composições são proporcionadas na forma de um sólido seco ao qual é subsequente adicionado um líquido ou um fluido. Numa concretização exemplificada, é usada uma composição em combinação com os reagentes de lise descritos neste documento.

Numa concretização, um método da invenção compreende o contacto de uma amostra que compreende ATA e ácido nucleico, com uma composição de ureia/DTPA da invenção. Numa concretização, a amostra pode compreender qualquer combinação de reagentes, como descrito num tampão de lise da invenção. A composição de ureia/DTPA da invenção pode ser preparada pela combinação de ureia com DTPA e opcionalmente EDTA, citrato de sódio, e quantidade suficiente de uma base, como o hidróxido de sódio para atingir pH 8,0, tal como definido na Tabela 1. Numa concretização, a mistura é aquecida acima de cerca de 600°C durante cerca de 4 horas, seca, moída num pó e, opcionalmente, combinada com proteinase K e metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glicopiranósido. O reagente de ureia/DTPA é proporcionado de preferência numa forma seca de modo a minimizar os volumes da amostra a jusante e evitar o procedimento de ter que adicionar proteinase K (PK) numa etapa separada (uma vez que a PK não é estável durante longos períodos de tempo em ureia 6,0 a 7,5 M). O reagente de ureia/DTPA moído é seco sob vácuo e adicionado (a 360 mg/ml de amostra de sangue) ao sangue tratado previamente com reagentes de lise descritos neste documento. A amostra tratada com ureia/DTPA é incubada cerca de 5-10 minutos a uma temperatura de cerca de 65°C. Quando as amostras tratadas com ATA e um

reagente de ureia/DTPA da invenção são combinadas com protocolos de extracção de ácido nucleico da arte anterior, onde são usadas matrizes ligantes, como a sílica ou outros materiais que ligam ácidos nucleicos na presença de sais caotrópicos ou onde é usada a precipitação e a centrifugação, o ATA não será co-purificado com o extracto de ácido nucleico. Noutra concretização, a proteinase K pode ser inactivada por exposição a temperaturas superiores a cerca de 80°C durante 5-10 minutos ou mais, a amostra é então arrefecida abaixo de cerca de 40°C, em que a urease é então adicionada a cerca de 1000-100 000 U/ml para quebrar a ureia. A amostra pode então ser aplicada directamente num dispositivo de *array* de ácido nucleico.

Usando os presentes métodos em conjunto com a PCR, podem ser detectadas 10 UFC de *Bacillus anthracis* por 10 ml de sangue. Não houve também diferença na cinética de RT-PCR derivada de amostras em PBS onde 1 ng de ARN MS2 foi semeado em extractos de ácido nucleico feitos com e sem ATA. Foram também detectadas 1000 ufp de vírus da poliomielite Sabin III / 8 ml de sangue completo SPS por RT-PCR quando os reagentes de lise descritos neste documento foram combinados com o reagente de ureia/DTPA e o protocolo acima descrito. Ao utilizar um reagente de ureia/DTPA da invenção, o ATA que estava presente antes do passo de digestão da proteinase K não teve um impacto negativo sobre a cinética da PCR usando os extractos de ácido nucleico que foram preparados utilizando os presentes métodos.

| Tabela 1. Conteúdo do reagente de ureia/DTPA em pó (após a adição de 1 ml de amostra a 360 mg reagente) | |
|--|-----------------------|
| Ureia | 6,0-7,5 M |
| Metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosido | 10 - 20 mg/ml |
| Proteinase K | 600 - 1000 μ g/ml |
| EDTA | 20 - 70 mM |
| DTPA | 20 - 70 mM |
| Citrato de sódio | 120 mM |
| Hidróxido de Sódio adicionado | até pH 8,0 |

Noutra concretização, se uma amostra não é processada com reagentes de lise tais como os descritos neste documento, então pode ser adicionado às células um tampão compreendendo somente ATA, como um primeiro passo, e tratar-se subsequentemente como acima descrito.

Noutra concretização, pode ser adicionada ureia a cerca de 6,0-7,5 M a uma amostra contendo ATA e então pode ser combinada com tampões ligantes baseados em sais caotrópicos, da arte anterior e matrizes ligantes de sílica, o protocolo conduzido de acordo com a citação na literatura ou as especificações do fabricante com a excepção do aquecimento do ligante baseado em sal caotrópico e do tampão de lavagem a cerca de 55 - 65°C antes de os usar com a amostra. A reacção da ureia com o Ácido Aurintricarboxílico (ATA) mais a combinação desta solução com o sal caotrópico a cerca de 55 - 65°C, seguida de aplicação numa matriz de captura de ácido nucleico à base de sílica permite a ligação selectiva do ácido nucleico à matriz e a exclusão do ATA (que passa através do fluxo na coluna). É a combinação da reacção com a ureia e o calor que proporciona a exclusão do ATA da matriz de captura de sílica enquanto o ácido nucleico se liga facilmente. O reagente de ureia/DTPA acima descrito produzido por aquecimento acima de 600°C durante a produção elimina a necessidade deste passo de aquecimento do sal caotrópico e permite uma remoção mais completa do ATA.

Noutra concretização, as amostras de sangue podem ser tratadas com misturas contendo ATA descritas neste documento em combinação com a captura de patogénios usando péptidos bioactivos funcionalizados em ácido hialurónico também como descrito neste documento onde o ácido hialurónico, por sua vez, actua como um guia de ondas polimérico. O ácido hialurónico é marcado com biotina através de grupos carboxilo ou amins e o excesso de biotina não ligada é posteriormente removido através de diálise. A estreptavidina é reticulada e o excesso de reticulante não ligado é removido através de diálise. A estreptavidina reticulada é adicionada ao ácido hialurónico biotinilado num excesso de 100 - 10 000 molar e incuba-se cerca de 4 - 10 horas, com ou sem um campo electroforético ou dielectroforético aplicado. Alternativamente, a estreptavidina é adicionada nas proporções

descritas, incubada durante cerca de 1 - 4 horas com agitação, combinada com um reagente reticulante foto-activado, e reticulada como num sistema de litografia, de modo a gerar estruturas posicionadas num percurso do fluxo da amostra. Neste sistema, é usada uma libertação de cálcio no local da captura do patogénio através de um péptido bioactivo ou de hibridação de espécies de ARN na presença de trombina (cerca de 10 - 500 µg por mililitro) para accionar a conversão local do fibrinogénio marcado com molécula repórter (cerca de 10-500 µg por mililitro) num agregado de fibrina insolúvel no local da captura do patogénio através de um péptido bioactivo ou de hibridação de espécies de ARN à matriz do guia de ondas polimérico ácido hialurónico. As moléculas repórter podem ser quaisquer moléculas que possam ser detectadas e incluem, por exemplo, moléculas fluorescentes (fluoresceína, etc.), moléculas radioactivas, enzimas, antigénios e similares. Como utilizado neste documento, os péptidos bioactivos incluem péptidos de ligação a vírus não específicos nativos e modificados, a maioria optimamente, tais como lactoferrina ou lactoferrina modificada com ácidos gordos, e péptidos de ligação a bactérias não específicos nativos e modificados, a maioria optimamente, como Cecropina P1 mas incluindo também, por exemplo, protamina, Buforina I, Buforina II, Defensina, D-Magainina II, Cecropina A, Cecropina B, Lectina PA-1 e Tritrpticina. Os péptidos modificados podem ser alterados em termos de conteúdo de aminoácidos e incluem os seus sais, ésteres, amidas e suas formas aciladas.

Noutra concretização, os péptidos bioactivos funcionalizados sobre o ácido hialurónico (que é reticulado através de biotina e estreptavidina) actuam como porções de captura de patogénios. Após a captura do patogénio ou do biomarcador, o ácido hialurónico é quebrado usando cerca de 1000 - 1 000 000 unidades de hialuronidase/ml de amostra dentro do dispositivo.

Noutra concretização, os componentes ATA, cloreto de magnésio e fosfato de potássio descritos no tampão de lise da presente invenção são combinados, levados a um pH de cerca de 9,2 - 10 em lotes de 100 ml, e aquecidos à ebulição até se formar um resíduo seco. O resíduo seco é moído, adicionalmente

seco sob vácuo e adicionado aos outros componentes enzima, detergente e trealose, tais como os descritos neste documento.

Lisboa, 2011-07-19

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a extracção de ácido nucleico de uma amostra que contém ácido aurintricarboxílico (ATA), compreendendo o contacto da amostra com uma composição compreendendo ureia e dietilenotriaminopenta-acetato (DTPA).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a concentração de ureia na amostra é de 6,0 - 7,5M.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a composição compreende adicionalmente citrato de sódio.

4. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente hidróxido de sódio.

5. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- α -D-glucopiranosido.

6. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente proteinase K.

7. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente etilenodiaminotetra-acetato.

8. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que o pH da amostra é levado a cerca de 8,0.

9. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que o método compreende adicionalmente o aquecimento da amostra.

10. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a amostra compreende adicionalmente um sal caotrófico.

11. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que o método compreende adicionalmente o contacto da amostra com um sal caotrófico.

12. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição é um pó seco.

13. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, o qual compreende o passo prévio de aquecimento de uma solução de ureia e DTPA a pelo menos 600°C antes da composição ser combinada com uma amostra.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que a solução de ureia e DTPA é aquecida durante cerca de quatro horas.

15. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a extracção de ácido nucleico compreende os passos de lavagem e/ou ligação, e os reagentes utilizados para os passos de lavagem e ligação são aquecidos a 55 - 65°C antes ou durante o contacto da amostra com os reagentes utilizados para os passos de lavagem e/ou ligação.

16. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 9, que adicionalmente compreende o contacto da amostra com urease.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que são adicionadas 1000 - 100 000 unidades da urease por ml de amostra.

18. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a amostra é sangue.

19. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a amostra é constituída por bactérias ligadas a partículas de fase sólida funcionalizadas com péptidos que se ligam às bactérias, em que as bactérias se ligam às referidas partículas numa composição que adicionalmente compreende ácido aurintricarboxílico.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que os péptidos que se ligam a bactérias são seleccionados entre Cecropina P1, protamina, Buforina I, Buforina II, Defensina, D-Magainina II, Cecropina A, Cecropina B, Lectina PA-1 e Tritrpticina, com ou sem alteração em termos de conteúdo de aminoácidos, seus sais, ésteres, amidas e suas formas aciladas.

Lisboa, 2011-07-19

Fig. 1

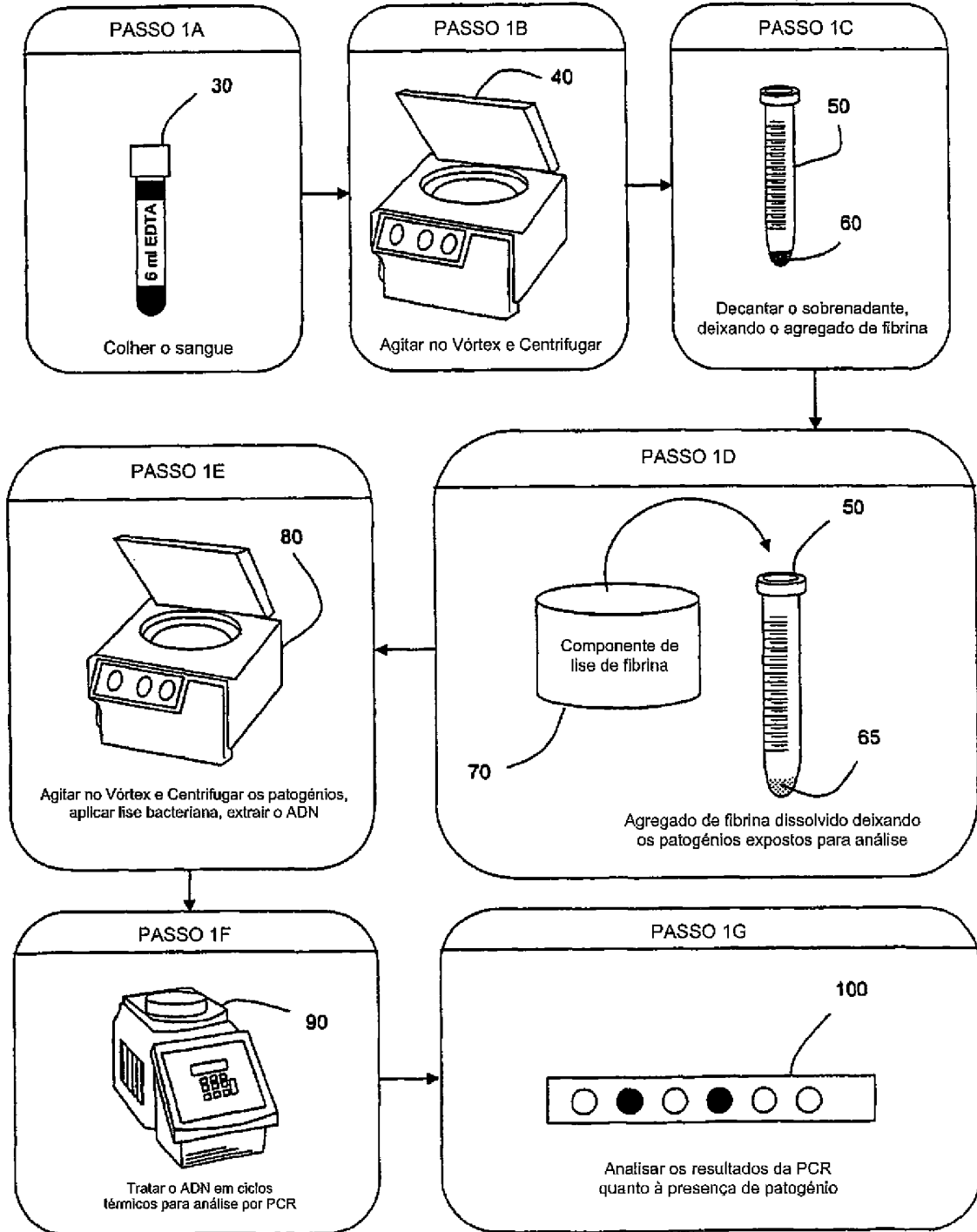


Fig. 2

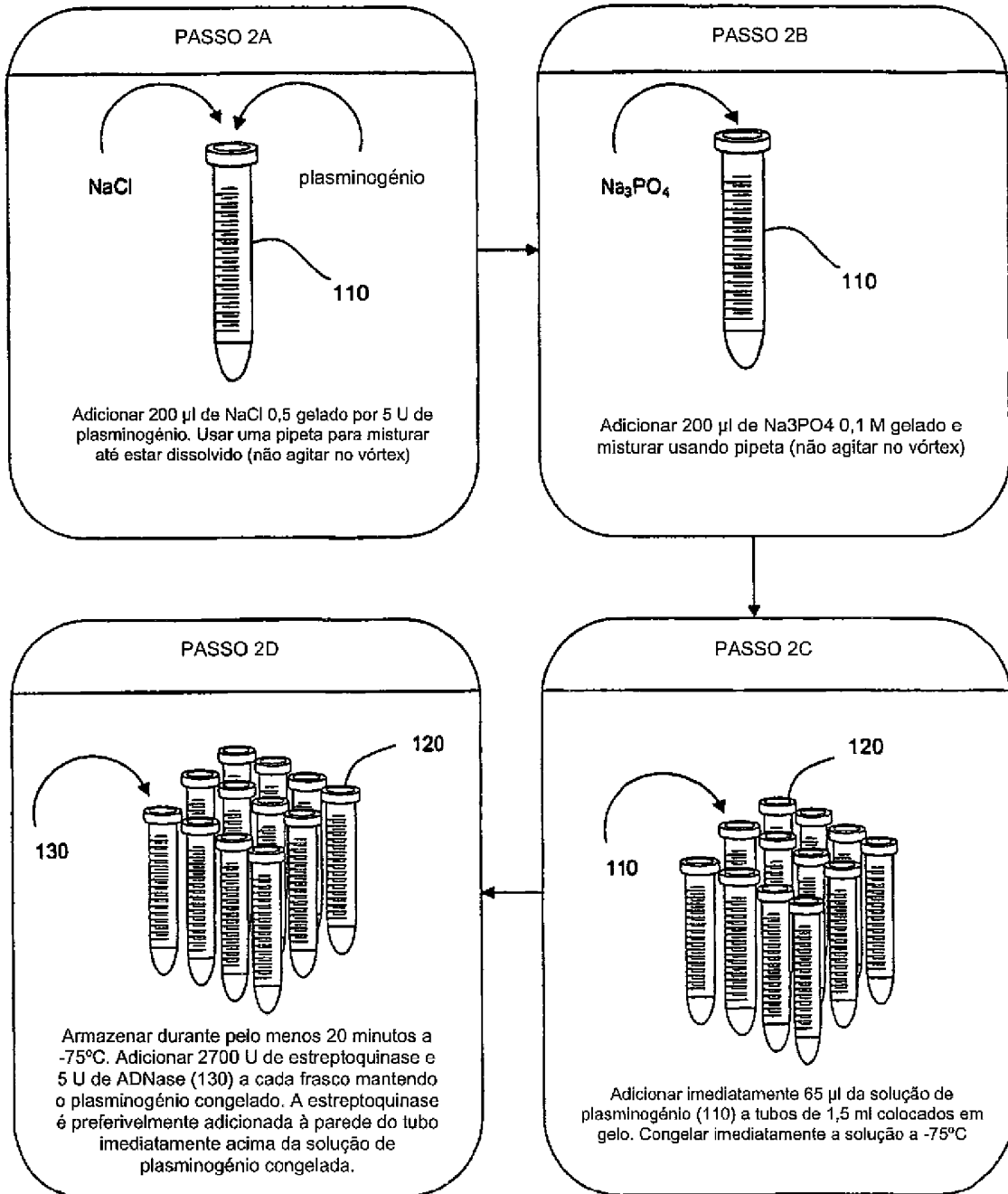


Fig. 3

Conjunto de dados do protocolo sanguíneo para *Bacillus anthracis*

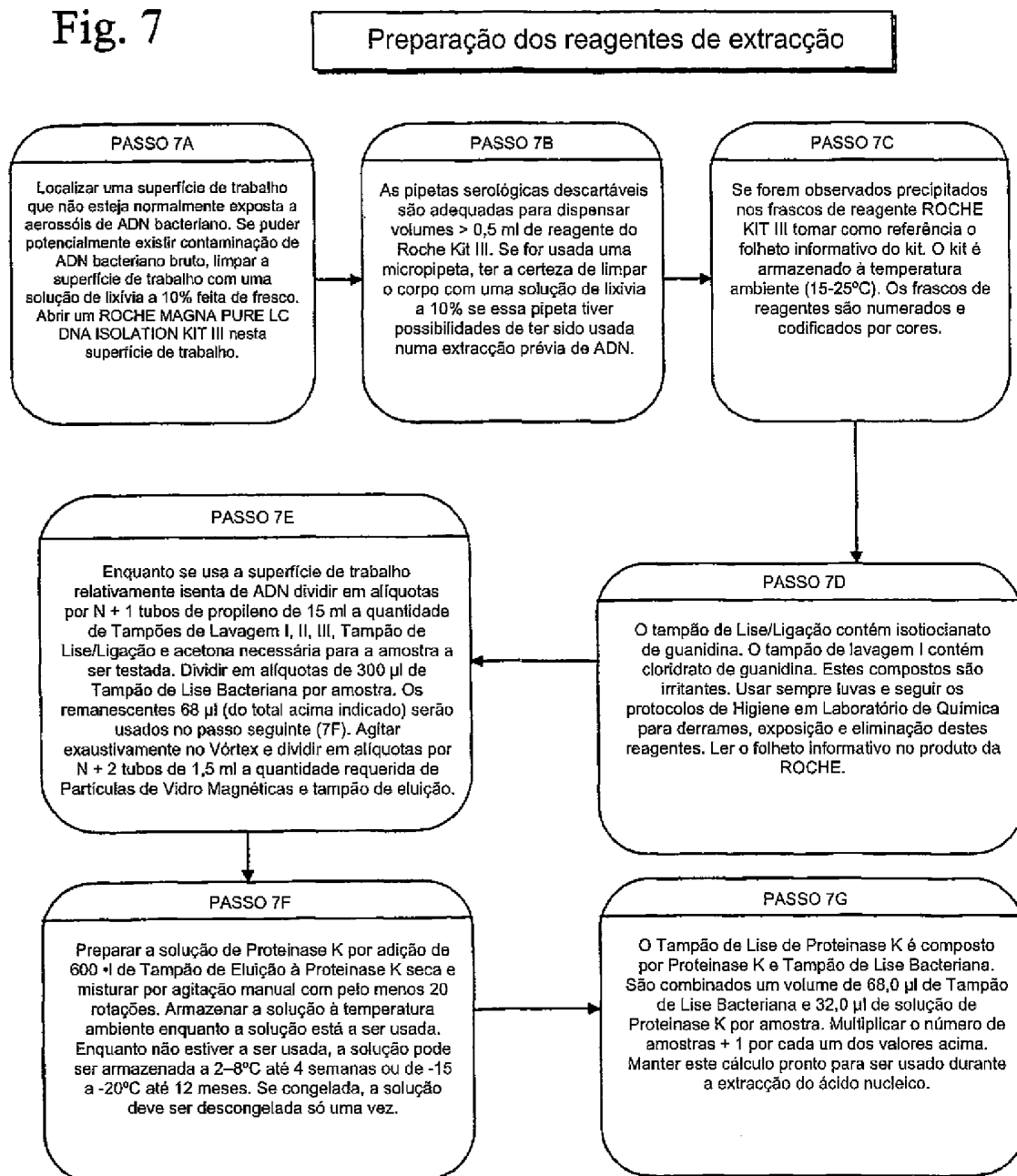
| Número da amostra | Iniciador de pXO2/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler | Iniciador genômico/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler | Média calculada de UFC / 6 ml de sangue | Comentários ao tipo de amostra: Todas as amostras testadas 2 dias após inoculação |
|-------------------|--|---|--|--|
| M3200253BA1 | 36.75 | 37.76 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA2 | 36.59 | 37.86 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA3 | 35.97 | 38.10 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA4 | 37.26 | 39.53 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA5 | 35.36 | 40.11 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA6 | 36.35 | 45.19 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA7 | 36.62 | 38.64 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M3200253BA8 | 37.04 | 39.51 | 13.75 | Inoc. positiva |
| M320020BA9 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Branco |
| M/3200226BA1 | 37.16 | 39.35 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA2 | 36.79 | 40.28 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA3 | 37.92 | 39.94 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA4 | 37.49 | 40.16 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA5 | 39.66 | 40.26 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA6 | 39.31 | 41.19 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/3200226BA7 | 38.48 | 40.73 | 1.38 | Inoc. positiva |
| M/320020BA8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Branco |

Fig. 4

Conjunto de dados do protocolo sanguíneo para *Bacillus anthracis*: Comparação de sangue de dois indivíduos diferentes e avaliação da idade da amostra sanguínea

| Número da amostra | Iniciador de pXO2/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler | Iniciador genômico/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler | Média calculada de UFC / 6 ml de sangue | Comentários ao tipo de amostra: Todas as amostras extraídas 84 dias após inoculação |
|-------------------|--|---|--|---|
| V210253BA1 | 37.73 | 39.81 | 10.5 | Dador de sangue 1 |
| V210253BA2 | 36.74 | 39.05 | 10.5 | Dador de sangue 1 |
| V210253BA3 | 36.51 | 37.99 | 10.5 | Dador de sangue 1 |
| V210253BA4 | 38.12 | 39.79 | 10.5 | Dador de sangue 1 |
| V21020BA5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Branco |
| M210253BA1 | 37.86 | 39.81 | 2.25 | Dador de sangue 2 |
| M210253BA2 | 37.84 | 39.22 | 2.25 | Dador de sangue 2 |
| M210253BA3 | 37.24 | 38.52 | 2.25 | Dador de sangue 2 |
| M210253BA4 | 38.68 | 39.33 | 2.25 | Dador de sangue 2 |
| M21020BA5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Branco |

Fig. 7



Recuperação bacteriana e lise de fibrina

Fig. 8

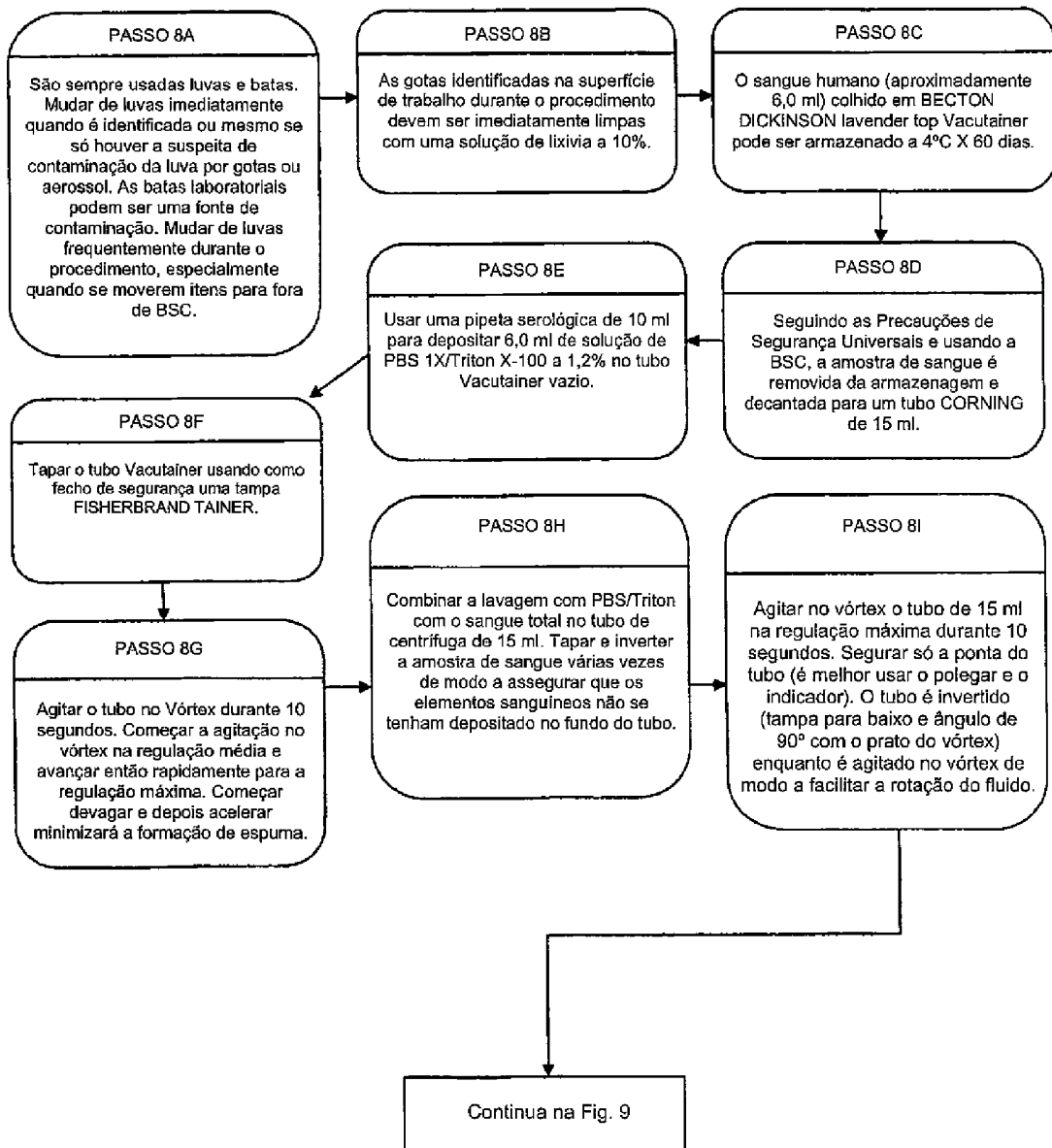


Fig. 9

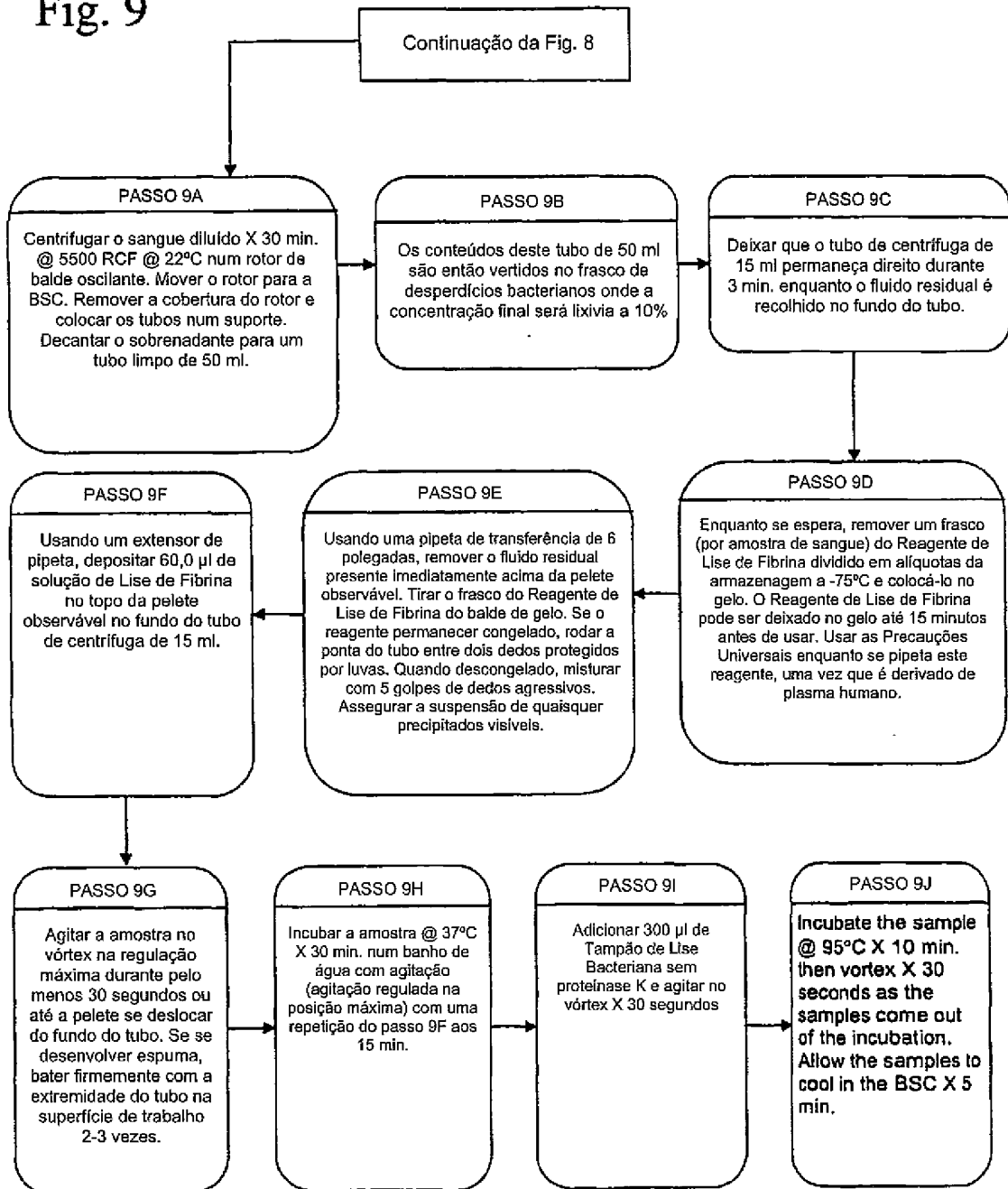


Fig. 10

Lise Bacteriana e Extracção de Ácido Nucleico

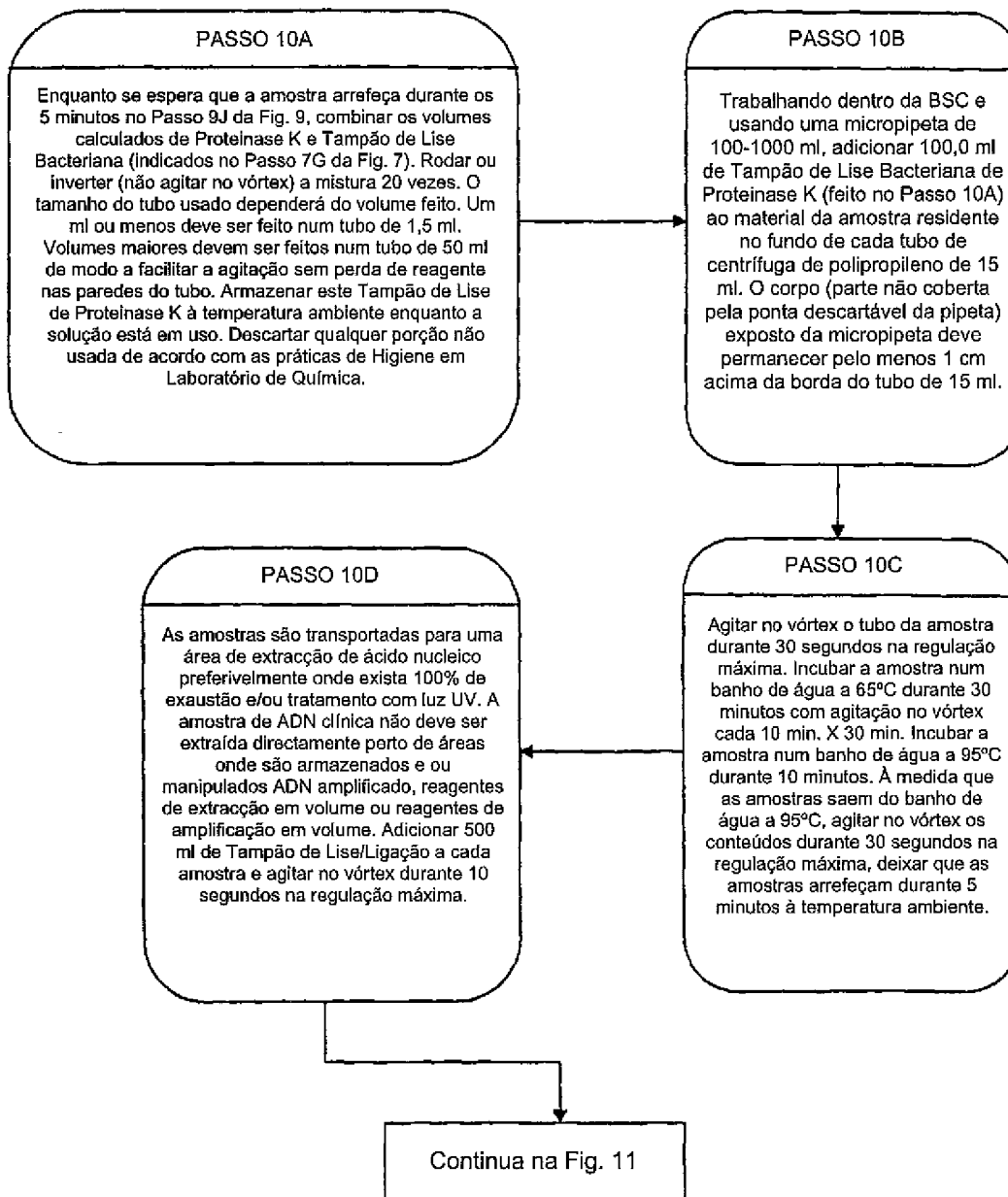


Fig. 11

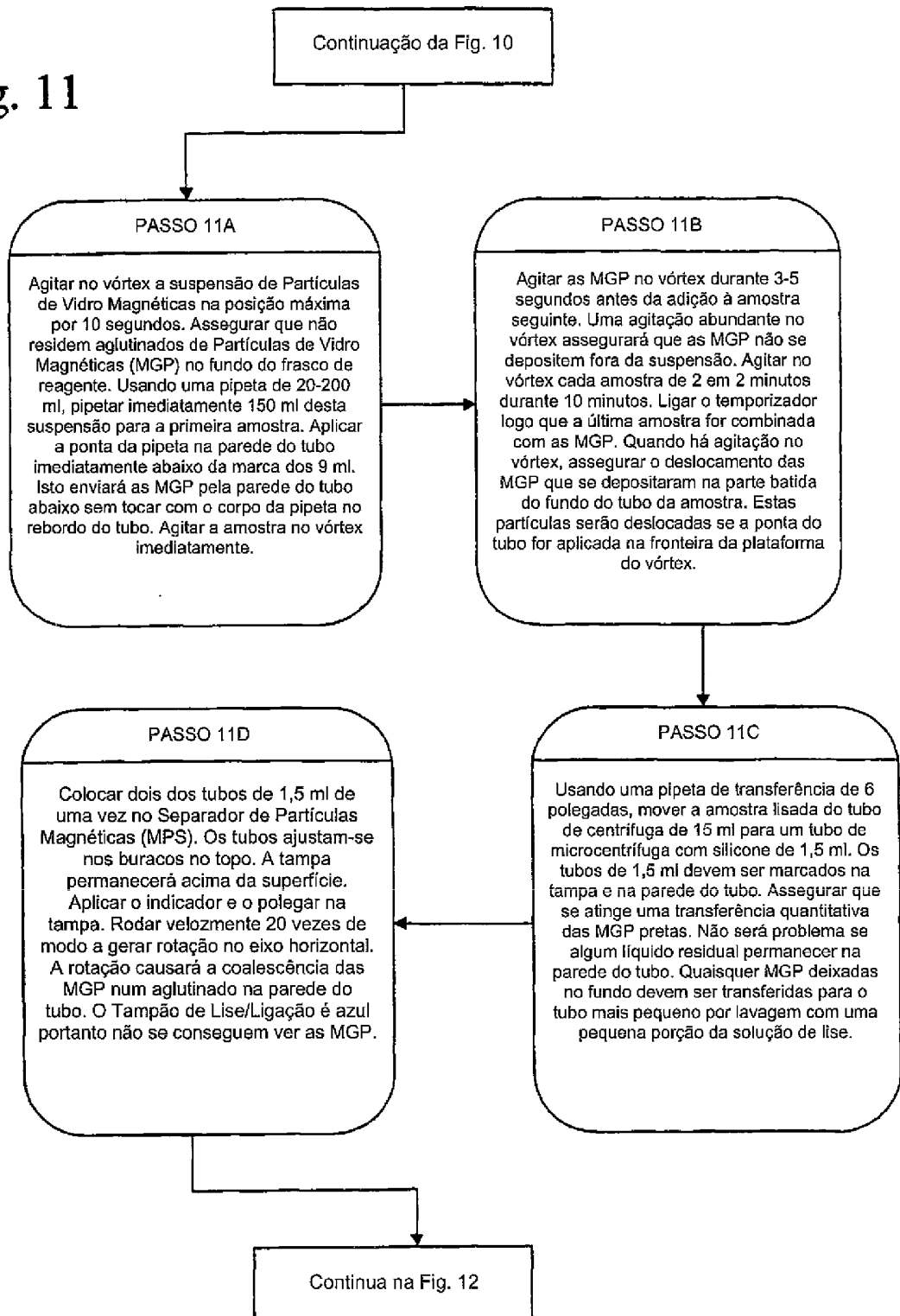


Fig. 12

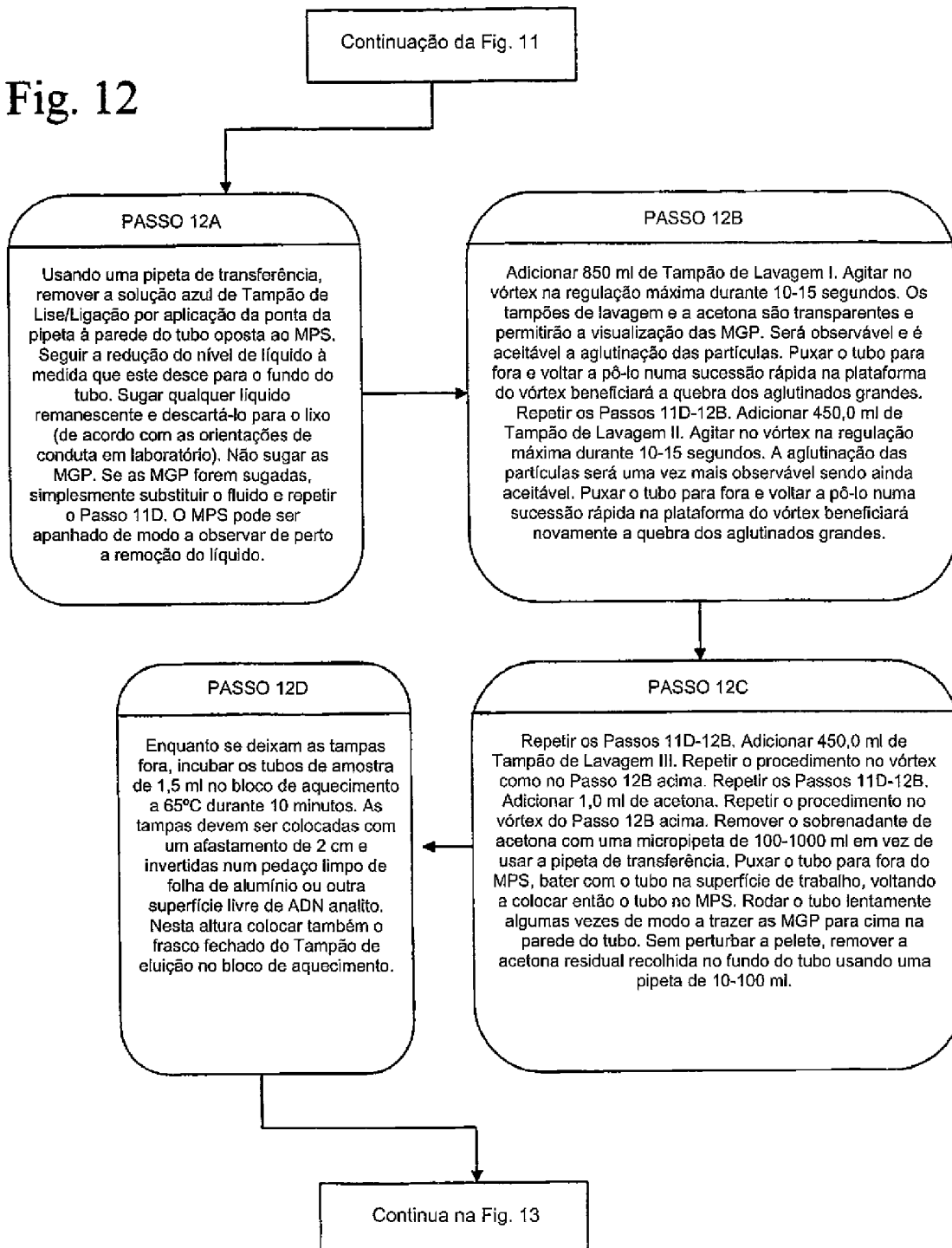


Fig. 13

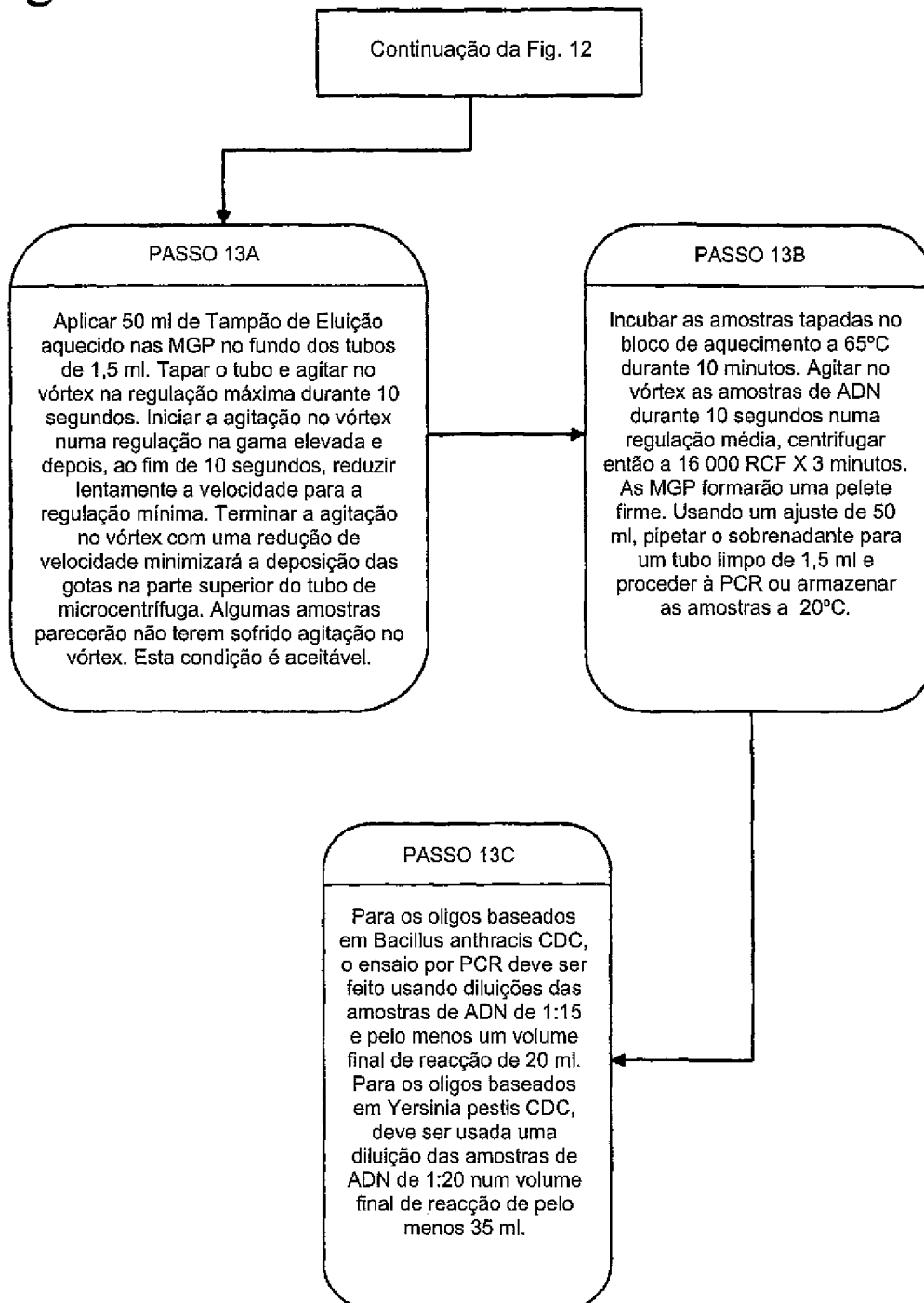


Fig. 14a

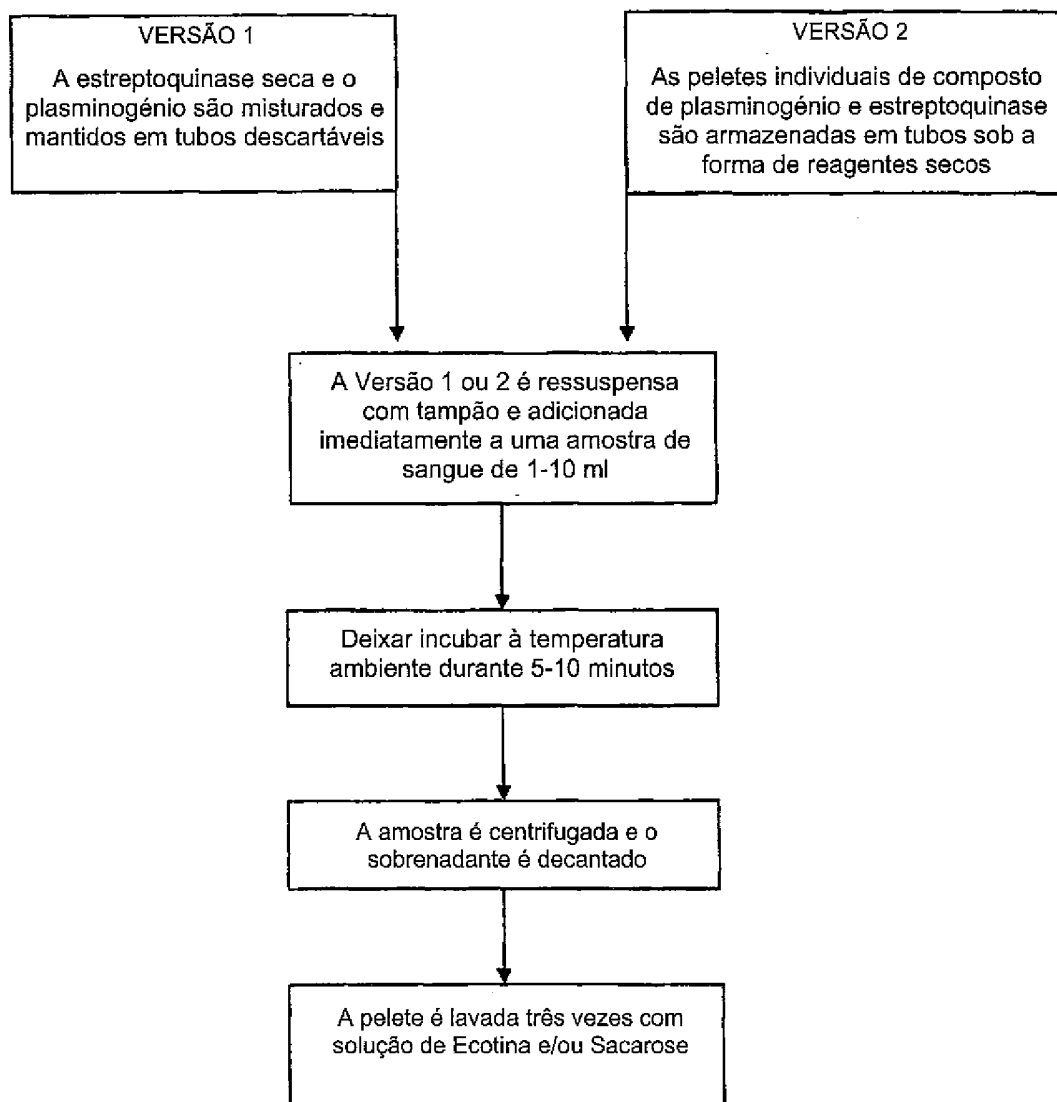


Fig. 14b

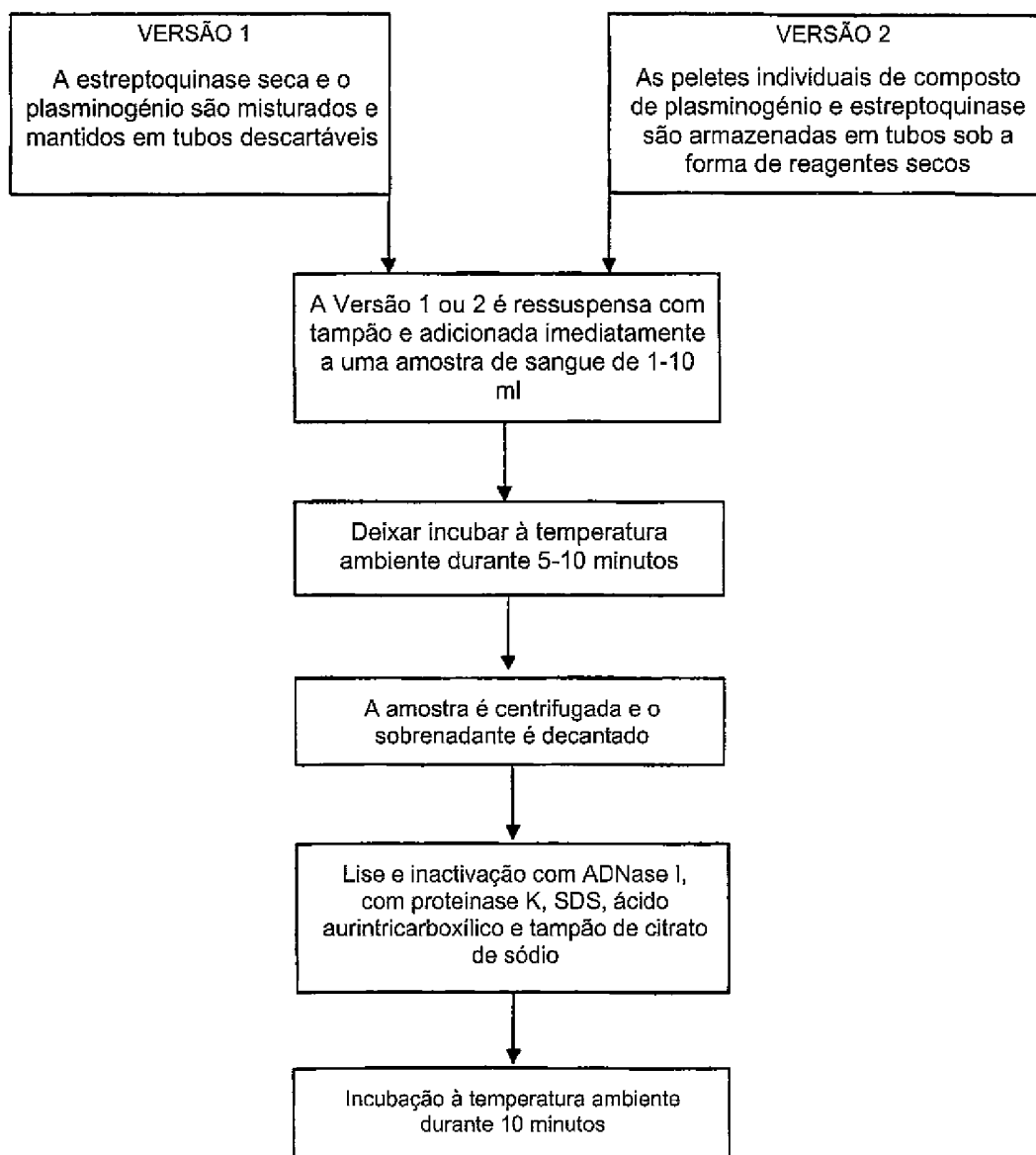


Fig. 15

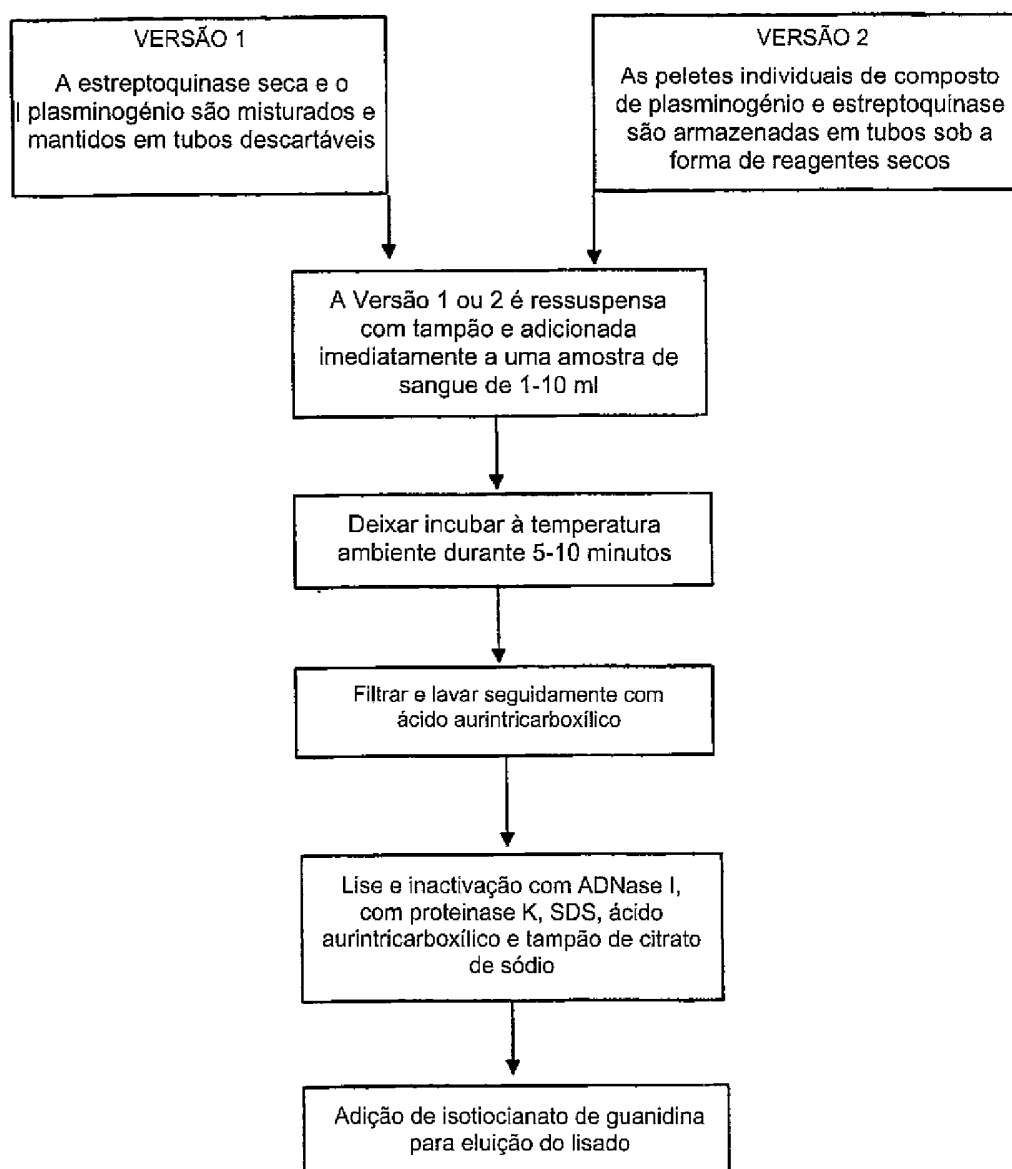


Fig. 16a

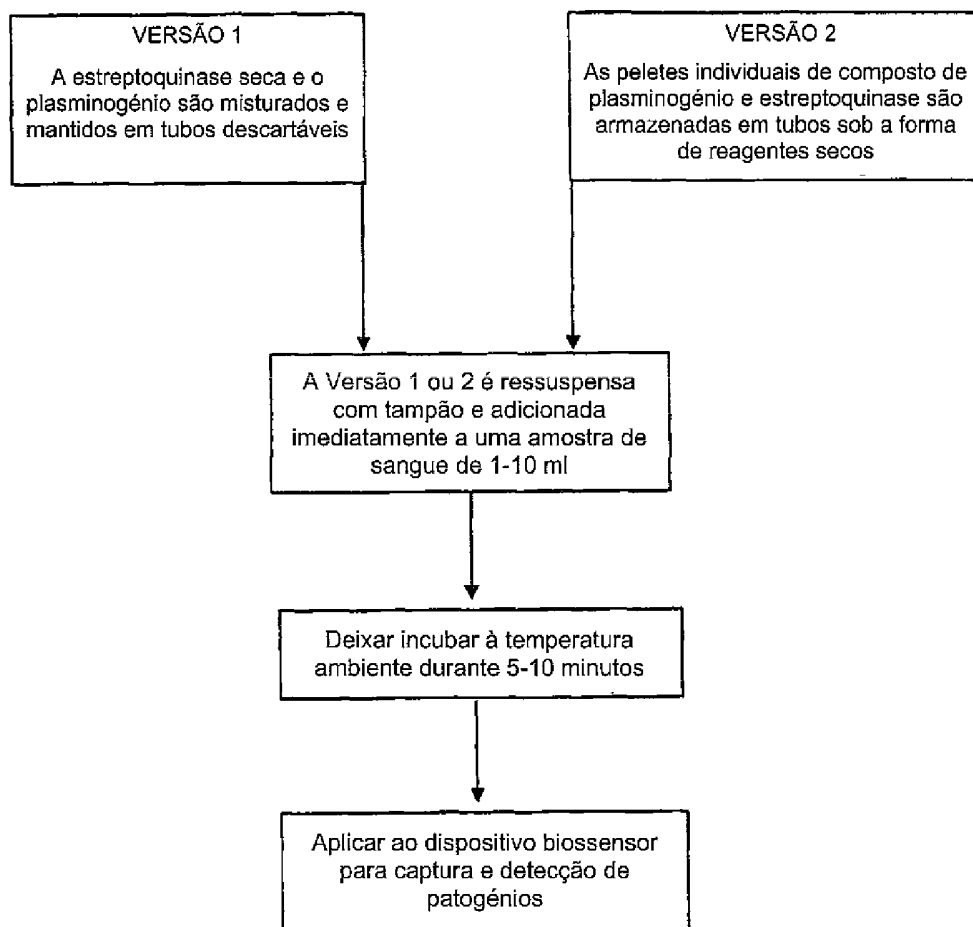


Fig. 16b

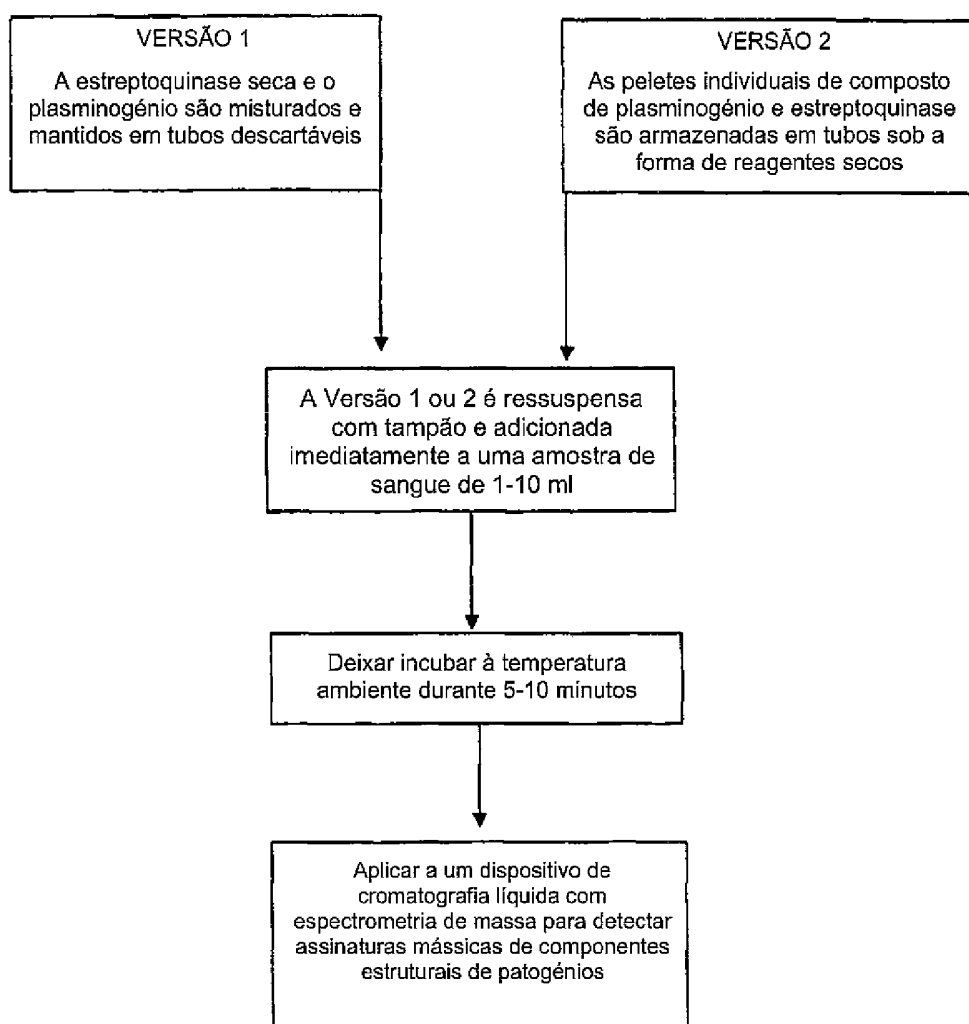


Fig. 17

Pontos de cruzamento de bandas de ruído para amostras sanguíneas inoculadas com *B. anthracis* e processadas com plasminogénio, estreptoquinase, fosfolipase A2, ADNase I e lipase com centrifugação ou filtração

| Quantidade de <i>B. anthracis</i> semeada (ufc) | Centrifugação | | | Filtração | | |
|---|--|-------|---------------|--|-------|---------------|
| | Pontos de cruzamento de bandas de ruído | | | Pontos de cruzamento de bandas de ruído | | |
| | | Média | Desvio Padrão | | Média | Desvio Padrão |
| ≤ 0.01 | | | | | | |
| ≤ 0.01 | | | | | | |
| ≤ 1.0 | | | | 40.33 39.89 | 40.11 | |
| ≤ 1.0 | | | | 37.79 | 37.79 | |
| ≤ 2.0 | | | | 40.36 37.69 | 39.03 | |
| ≤ 2.0 | 41.93 40.31 | 41.12 | | | | |
| ≤ 5.0 | | 40.47 | 40.47 | 37.90 37.70 37.79 | 37.80 | 0.10 |
| ≤ 5.0 | 38.11 40.36 | 39.24 | | 36.45 36.09 36.81 | 36.45 | 0.36 |
| ≤ 50.0 | 37.53 36.24 37.90 | 37.22 | 0.87 | 35.75 34.12 34.98 | 34.95 | 0.82 |
| ≤ 50.0 | 36.45 38.15 38.49 | 37.70 | 1.09 | 35.24 34.18 34.68 | 34.70 | 0.53 |

Fig. 18

Sedimentação e solubilização de agregados de tecido a partir de amostras de sangue de 6 ml expostas a vários tratamentos com enzimas e detergentes

| Tratamentos com enzima num tampão PBS/Triton X-100 ^d | | | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------|--|--|
| | Triton X-100 em PBS | Pl. ^c 1U | Ph. ^b | Pl. ^c 1U Ph. ^b | Dn. ^a 1mg | Dn. ^a 1 mg Ph. ^b | Dn. ^a 1 mg Pl. ^c 1U Ph. ^b |
| % Observável de agregado de tecido sedimentado após a centrifugação | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 10 | 10 |
| Tempo (min) para a solubilização de agregado de tecido visível em BLBd | > 360 | > 60 | > 60 | > 60 | < 10 | < 0.5 | < 0.5 |

^a ADNase I do Roche MagNa Pure LC DNA Kit III

^b Fosfolipase A₂

^c Plasminogénio e 10K U de estreptoquinase

^d Tampão de Lise Bacteriana do Roche MagNa Pure LC DNA Kit III

Fig. 19

Características de filtração de amostras de sangue de 6 ml expostas a vários tratamentos com enzimas e detergentes

| Tratamentos com enzima num tampão PBS/Triton X-100 | | | | | | | |
|--|---------------------|----------------------|--|---------------------|---|---|--|
| | Triton X-100 em PBS | Dn. ^a 1mg | Dn. ^a 1 mg Ph. ^b | Pl. ^c 5U | Pl. ^c 5U Dn. ^a 1mg Ph. ^b | Pl. ^c 5U Dn. ^a 0.2mg Ph. ^b | Pl. ^c 10U Dn. ^a 0.2mg Ph. ^b |
| Não filtrável | + | + | + | | | | |
| Filtrável com agregados de tecido observáveis | | | | + | | + | |
| Filtrável sem agregados de tecido observáveis | | | | | + | | + |

^a ADNase I do Roche MagNa Pure LC DNA Kit III

^b Fosfolipase A₂

^c Plasminogénio convertido em plasmina com 10K U de estreptoquinase