

DESCRIPCIÓN

Materiales y procedimientos para capturar patógenos y retirar el ácido aurintricarboxílico de una muestra.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al retirado de ácido aurintricarboxílico (ATA) de una muestra.

Antecedentes de la invención

10 El ATA es un anión polimérico que en la literatura ha demostrado ser un inhibidor potencial de la ribonucleasa. El compuesto se ha descrito anteriormente como un aditivo a los reguladores de lisis de muestra en los que el objetivo es extraer especies de ARN a partir de tejidos de muestras. El extracto de ácido nucleico derivado de tales procedimientos ha demostrado ser adecuado para la hibridación y el análisis de electroforesis de gel. Sin embargo, ATA es un potente 15 inhibidor de la transcriptasa inversa, que es esencial para la detección de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las especies de ARN.

20 Los procedimientos publicados para retirar ATA de las composiciones que contienen ácido nucleico se han centrado en los procedimientos cromatográficos que eliminan o retiran solo una porción de ATA. Por ejemplo, antes del procedimiento de extracción de ácido nucleico se utilizan sales caotrópicas tales como el tiocianato de guanidina en presencia de matrices de captura tales como sílice o procedimientos de precipitación para concentrar ácidos nucleicos de las muestras en estado natural.

25 La utilización de ATA en el regulador de lisis de la proteinasa K es superior potencialmente a 1) las sales caotrópicas (ya que éstas tienden a reducir la eficacia de la hidrólisis de proteína impulsada por la proteinasa K según evidencian los resultados de PCR); 2) los inhibidores de ribonucleasa basados en proteína (ya que estos inhibidores se escindirían por la proteinasa K); y 3) EDTA (que inhibe directamente solo las nucleasas vía quelación de los cationes divalentes utilizados por estas nucleasas). De hecho, los cationes divalentes se deben añadir a las preparaciones de ARN en las que se lleva a cabo la hidrólisis de ADN enzimática.

30 Sumario de la invención

35 Según la presente invención, un procedimiento para la extracción de ácido nucleico a partir de una muestra que comprende ácido aurintricarboxílico (ATA) y una sal caotrópica, comprende la adición de una composición que comprende añadir urea y dietilentriaminpentaacetato (DTPA) a la muestra antes del aislamiento del ácido nucleico, en el que el ácido nucleico está libre de ATA.

Las características preferidas de la presente invención se proporcionan en las reivindicaciones 2 a 15.

40 La presente invención se refiere asimismo a materiales y a procedimientos para calentar una solución de urea, DTPA, que contiene opcionalmente EDTA, citrato de sodio, y cloruro de sodio, a por lo menos 600°C durante 4 horas, seguido de un secado y combinación con la proteinasa K y opcionalmente con 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo y a la utilización de este reactivo para permitir el retirado de ATA de los extractos de ácido nucleico preparados según los procedimientos de la anterior técnica existente basados en las sales caotrópicas, 45 seguidos de una centrifugación o procedimientos descritos en la presente memoria, para permitir la hibridación de secuencia corriente abajo de las especies de ARN directamente de las muestras de sangre completa tratadas.

50 La presente invención se refiere asimismo al reactivo urea/DTPA que se trata con calor por encima de 600°C durante 4 horas durante la producción y se utiliza en un tratamiento de muestra según se ha descrito anteriormente, seguido de una combinación de ureasa para escindir la urea seguido de un análisis de matriz de ARN.

55 El ácido aurintricarboxílico (ATA) es un anión polimérico que en la literatura ha demostrado ser un potente inhibidor de la ribonucleasa. El compuesto se ha descrito anteriormente como un aditivo de los reguladores de lisis de muestra en la que el objetivo es extraer especies de ARN a partir de muestras de tejido. El extracto de ácido nucleico derivado de tales procedimientos ha demostrado ser adecuado para la hibridación y el análisis de electroforesis de gel. Sin embargo, ATA es un potente inhibidor de la transcriptasa inversa, que es esencial para la detección de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las especies de ARN. Los procedimientos publicados para retirar ATA a partir 60 de composiciones que contienen ácido nucleico se han centrado en los procedimientos cromatográficos que eliminan o retiran solo una porción de ATA.

60 La utilización de ATA en un regulador de lisis de proteinasa K es potencialmente superior a 1) sales caotrópicas (ya que tienden a reducir la eficacia de la hidrólisis de proteína impulsada por la proteinasa K según evidencian los resultados de PCR); 2) inhibidores de ribonucleasa basados en proteína (ya que estos inhibidores se escindirían mediante la proteinasa K); y 3) EDTA (que sólo inhibe directamente las nucleasas vía quelación de los cationes divalentes utilizados por estas nucleasas). De hecho, los cationes divalentes se deben añadir a las preparaciones de ARN en las que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de ADN. Lo que no se ha demostrado en la técnica anterior es un procedimiento en el que, una vez añadido, se pueda conseguir retirar completamente el ATA de secuencia corriente

abajo a partir de extractos de ácido nucleico hasta el punto en que funcionará la PCR transcriptasa inversa de secuencia hacia abajo (RT-PCR).

Tampoco se ha descrito anteriormente en la técnica una manera de utilizar ATA en un regulador de lisis para tratar

5 un volumen grande (1-10 ml) de muestra de sangre completa y después de diversas etapas de adición de reactivos pasar directamente a una hibridación de la matriz de ARN utilizando la muestra de sangre completa en un caso de análisis por lo tanto desviando la extracción de ARN y la amplificación.

Tampoco se ha descrito anteriormente en la técnica una manera de utilizar muestras de sangre tratadas con ATA

10 que contienen mezclas en combinación con la captura de patógeno utilizando péptidos bioactivos funcionalizados en ácido hialurónico detallado en la solicitud US nº 10/604.779, en la que el ácido hialurónico actúa a su vez como una guíaonda polimérica.

Tampoco se ha descrito anteriormente en la técnica una manera de provocar una liberación de calcio en el sitio

15 de la captura de patógeno mediante un péptido bioactivo o el apareamiento de las especies de ARN de forma que provoquen la conversión de fibrinógeno marcado en la molécula informadora a fibrina insoluble en el sitio de la captura de patógeno mediante péptido bioactivo o el apareamiento de las especies de ARN sobre la matriz de la guíaonda polimérica de ácido hialurónico.

20 El ATA presenta asimismo una importante función en la protección de ADN bacteriano cuando esta bacteria está presente en una muestra de sangre tratada con reactivos que contiene niveles elevados (≥ 100 U/ml) de ADNasa I según se utiliza en diversas formas de realización contenidas en la solicitud US nº 10/604.779. Para conseguir las capacidades de detección de ARN que son superiores a las que se pueden conseguir con tecnología descrita en la solicitud US nº 10/604.779 y para hacerlo sin etapas o requisitos adicionales, se utiliza la presente invención en combinación con 25 la tecnología de tratamiento de muestra de sangre descrita en la solicitud nº US 10/604.779 y los procedimientos de extracción de ácido nucleico de la técnica anterior que utilizan sales caotrópicas tales como tiocianato de guanidina en presencia de matrices de captura tales como sílice o procedimientos que utilizan procedimientos de precipitación para concentrar ácidos nucleicos de muestras en estado natural.

30 En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de: 1) un procedimiento de destrucción y de solubilización del espectro de los componentes de la sangre (eritrocitos, leucocitos, membranas nucleares, fibrina y ácido nucleico huésped) sin perjudicar las partículas de analito (bacteria, virus, hongo, toxina, marcadores metabólicos, marcadores de estado de la enfermedad o agentes químicos) para exponer y concentrar rápidamente (mediante centrifugación, filtración o captura) las partículas de analito de grandes volúmenes de sangre, 2) eliminación del ADN huésped y 35 de la biomasa asociada a la matriz presente en una muestra de sangre de gran volumen utilizando un combinado de detergente enzimático de etapa única disponible para la automatización y para sistemas portátiles, y 3) un procedimiento de concentración de partícula de analito que se puede acoplar a los procedimientos manuales o automatizados existentes de extracción de ácido nucleico, ensayo de biosensor, o separación por cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas.

40

Breve sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y a materiales para la extracción de patógenos infecciosos a partir de un volumen de una muestra, tal como sangre, e incluye las etapas de creación de un agregado de fibrina que confina los patógenos e introduce un reactivo de lisis de fibrina para exponer los patógenos al análisis y a la ADNasa para facilitar la extracción de ADN. Los reactivos de lisis de fibrina se pueden componer de ADNasa, plasminógeno y estreptocinasa congelados en una proporción igual hasta que se necesita el reactivo de lisis de fibrina en el que la estreptocinasa reacciona enzimáticamente con plasminógeno para formar plasmina tras la descongelación y la introducción en la muestra de fibrina. Preferentemente, se suspende el plasminógeno en una solución salina acuosa antes de la congelación que incluye NaCl y Na₃PO₄. El reactivo de lisis de fibrina se compone preferentemente de ADNasa y fosfolipasa A₂. La enzima ADNasa se utiliza para facilitar la disruptión química y física de elementos de sangre granulados que resultan del protocolo descrito anteriormente. La fosfolipasa A₂ se utiliza para ayudar a la digestión de ADN humano mediante la destrucción de bicapas de fosfolípidos y, por lo tanto, la destrucción de la membrana nuclear.

55

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar materiales y procedimientos para eliminar eficazmente el ATA de una muestra, tal como una muestra que consiste en una composición de ácido nucleico. Los procedimientos del objetivo proporcionan una composición de ácido nucleico suficientemente libre de ATA tal que se puedan llevar a cabo la reacción RT-PCR y otras reacciones que impliquen la transcriptasa inversa.

60

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar materiales y procedimientos para una mezcla de ATA, cloruro de magnesio, fosfato de potasio y cloruro de sodio que se seca y se combina con otros componentes secos tales como los descritos en la presente memoria.

65

El objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar materiales y procedimientos para el calentamiento de una solución de urea, dietilentriaminopentaacetato (DTPA), que contiene opcionalmente EDTA, citrato de sodio, y cloruro de sodio, a por lo menos 600°C durante 4 horas seguido de un secado y en combinación con la proteinasa K y opcionalmente con 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo y la utilización de este

reactivo para permitir la eliminación de ATA a partir de extractos de ácido nucleico preparados con los procedimientos existentes de la técnica anterior basados en la precipitación de las sales caotrópicas o de ácidos nucleicos seguidos de centrifugación o procedimientos descritos en la presente memoria para permitir la hibridación secuencia corriente abajo de las especies de ARN directamente de las muestras de sangre completa tratadas.

5 El objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar el reactivo urea/DTPA que se calentó a una temperatura superior a 600°C durante 4 horas durante la producción y se utilizó en un tratamiento de muestra según se ha descrito anteriormente seguido de la combinación de ureasa para escindir la urea seguido de un análisis de matriz de ARN.

10 El objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar materiales y procedimientos para la captura de patógeno utilizando péptidos bioactivos funcionalizados en ácido hialurónico según se ha descrito en la presente memoria en la que el ácido hialurónico a la vez actúa como una guíaonda polimérica.

15 El objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar procedimientos que causan una liberación de calcio en el sitio de la captura de patógeno mediante un péptido bioactivo o mediante el apareamiento de las especies de ARN de forma que provoquen la conversión del fibrinógeno marcado en la molécula informadora para insolubilizar la fibrina en el sitio de la captura del patógeno mediante un péptido bioactivo o el apareamiento de las especies de ARN sobre la matriz de la guíaonda polimérica de ácido hialurónico.

20 El objetivo de la presente invención consiste asimismo en proporcionar materiales y procedimientos en los que la matriz de ácido hialurónico que está reticulada utilizando biotina y estreptavidina y funcionalizada con péptidos bioactivos, tales como los descritos en la presente memoria, se pueden escindir posteriormente con hialuronidasa para facilitar la elución del patógeno.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una vista esquemática de un procedimiento para el análisis del patógeno.

30 La figura 2 es una vista esquemática de la preparación del reactivo de lisis de la fibrina según el protocolo 1.

La figura 3 es una tabla que proporciona datos sobre el protocolo de sangre del *Bacillus anthracis*.

35 La figura 4 es una tabla que proporciona datos sobre una comparación de dos muestras de sangre de individuos diferentes.

La figura 5 es una tabla que proporciona datos sobre una evaluación del laboratorio del Departamento de Salud.

40 La figura 6 es una tabla que proporciona datos sobre el protocolo de sangre *Yersinia pestis*.

La figura 7 es una vista esquemática del montaje de los reactivos de extracción según el protocolo 1.

45 Las figuras 8-9 son vistas esquemáticas de la recuperación bacteriana y de la lisis de la fibrina según el protocolo 1.

Las figuras 10-13 son vistas esquemáticas de la lisis bacteriana y de la extracción de ácido nucleico según el protocolo 1.

50 La figura 14a es una vista esquemática de las etapas de reactivos de la extracción según el protocolo 2.

La figura 14b es una vista esquemática de las etapas de reactivos de la extracción según el protocolo 2.

La figura 15 es una vista esquemática de las etapas de reactivos de la extracción según el protocolo 3.

55 La figura 16a es una vista esquemática de las etapas de reactivos de la extracción según el protocolo 4.

La figura 16b es una vista esquemática de las etapas de reactivos de la extracción según el protocolo 4.

60 La figura 17 es una tabla que proporciona datos sobre la banda de ruido de los puntos en forma de cruz para las muestras de sangre sembradas con *B. anthracis* y tratadas con plasminógeno, estreptocinasa, fosfolipasa A₂, ADNasa I y lipasa con centrifugación o filtración.

La figura 18 representa la sedimentación y la solubilización de los agregados de tejido a partir de muestras de sangre de 6 ml expuestas a diversos tratamientos de detergentes y enzimas.

65 La figura 19 representa las características de filtración de muestras de sangre de 6 ml expuestas a diversos tratamientos de detergentes y enzimas.

Exposición detallada de la invención

La presente invención se describirá en el contexto de la extracción de patógenos infecciosos de una muestra biológica, tal como un volumen de sangre, e incluye las etapas de creación de un agregado de fibrina que confina los 5 patógenos y la introducción de un reactivo de lisis de fibrina para exponer los patógenos al análisis y a la ADNasa para facilitar la extracción de ADN. Los reactivos de lisis de fibrina están constituidos por ADNasa, plasminógeno y estreptocinasa congelados en una proporción igual hasta que se necesite el reactivo de lisis de fibrina en el que la estreptocinasa reacciona enzimáticamente con plasminógeno para formar plasmina tras la descongelación y la introducción en la muestra de fibrina. Preferentemente, el plasminógeno se suspende en una solución salina acuosa antes 10 de congelarse incluyendo NaCl y Na₃PO₄. El reactivo de lisis de fibrina está compuesto preferentemente de ADNasa y fosfolipasa A₂. La enzima ADNasa se utiliza para facilitar la disruptión química y física de los elementos sanguíneos granulados que resultan del protocolo descrito anteriormente. La fosfolipasa A₂ se utiliza para ayudar a la digestión de ADN humano mediante la destrucción de las bicapas de fosfolípidos y, por lo tanto, de la destrucción de la membrana 15 nuclear.

15 La presente invención utiliza la resuspensión de las enzimas secas en una solución de regulador utilizando fosfato de potasio como una ayuda para la solubilización de los elementos sanguíneos. La estreptocinasa y el plasminógeno no se deben mezclar con la solución de regulador hasta inmediatamente antes de la adición de la muestra de sangre. El intervalo de pH del fosfato de potasio es aproximadamente de 7,8 a 8,0, que es diferente de la técnica anterior 20 que reivindica un intervalo de pH eficaz de 7,2 a 7,6. La técnica anterior utiliza soluciones de iones fosfato con un pH inferior para actuar como un regulador verdadero; sin embargo, el procedimiento actual permite la actividad de la fosfolipasa A₂ óptima y la solubilidad del magnesio. El magnesio está presente en la solución de regulador como el catión divalente que impulsa la actividad de la fosfolipasa A₂ en presencia de la ADNasa. La técnica anterior utiliza calcio como el catión divalente clásico para impulsar la actividad de la fosfolipasa A₂, sin embargo, el calcio no es 25 compatible con los iones fosfato esenciales para la solubilización de elementos de sangre.

30 Una forma de realización de la presente invención incluye concentrar y extraer partículas tales como priones, toxinas, marcadores metabólicos, materias cancerosas, marcadores de estado de enfermedad, bacterias, virus y hongos de un volumen de sangre mediante la introducción de una combinación enzima-detergente para exponer los patógenos en la muestra de sangre y analizar las partículas de la muestra de sangre entonces fácilmente identificables mediante la extracción. La enzima-detergente puede ser un reactivo de lisis de fibrina que comprende plasminógeno y estreptocinasa. El plasminógeno y la estreptocinasa se pueden congelar en una proporción igual hasta que se necesite el reactivo 35 de lisis de fibrina. La estreptocinasa reacciona a continuación con el plasminógeno para formar plasmina tras el descongelado. El plasminógeno se puede suspender en una solución salina acuosa antes del congelado. Las soluciones salinas adecuadas pueden incluir NaCl, NaPO₄ o similares. Para potenciar el análisis, las partículas se pueden replicar mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

40 Mediante la introducción de la ADNasa, se facilita el procedimiento mediante la conversión de ADN en fragmentos cortos que contribuyen así a un procedimiento de hidrólisis de proteína más rápida y más eficaz durante la extracción de ADN y la disminución de la carga del ADN humano inhibidor. De forma similar, la introducción de la endonucleasa produce una ventaja similar.

45 Como una alternativa a la congelación, la enzima-detergente puede incluir estreptocinasa y plasminógeno secos como reactivos de lisis de fibrina. Los reactivos secos se pueden mezclar a continuación y distribuir en contenedores de ensayo de un solo uso. Esta forma de realización puede ser particularmente útil para la experimentación práctica en lugares en los que el equipo y controles de laboratorio sofisticado no estén disponibles.

50 El plasminógeno se puede combinar con fosfolipasa A₂, ADNasa, endonucleasa, lipasa y combinaciones de las mismas. La combinación enzima-detergente seca se puede suspender en gránulos de regulador de trehalosa y acondicionarlos en tubos como un reactivo seco. Los reactivos secos se pueden resuspender a continuación en un regulador, añadir a 1-10 ml de volumen de sangre e incubar durante aproximadamente 5-20 minutos a temperatura ambiente. Más específicamente, el reactivo seco comprende de aproximadamente 1.500-4.500 KU de fosfolipasa A₂, aproximadamente 5.000-10.000 U de estreptocinasa, aproximadamente 2-10 U de plasminógeno, aproximadamente 200-3.650 U de ADNasa, aproximadamente 200-4.000 U de endonucleasa y aproximadamente 10.000-100.000 de lipasa.

55 La solución se puede centrifugar durante aproximadamente 20 minutos a 5.000-5.500 x g a una temperatura de 10-20°C, se decanta el sobrenadante y se lava el gránulo. El gránulo se puede lavar tres veces con una solución de Ecotine 10-20 mM/HEPES 20 mM pH 7,7 y/o una solución sacarosa 10-20 mM/HEPES 20 mM pH 7,7. La muestra que resulta se puede aplicar a continuación a un procedimiento de extracción de ácido nucleico disponible comercialmente.

60 La digestión de la muestra puede incluir la lisis y la inactivación de la ADNasa o la lisis y la inactivación de la endonucleasa. Se pueden utilizar 12,5-25 mg de proteinasa K, SDS (dodecilsulfato de sodio) 1-105%, ácido aurintricarboxílico 10-200 mM y regulador de citrato de sodio 10-20 mM pH 7,8-8,4, la solución se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La muestra se puede filtrar a continuación con una unidad de filtro de 0,22-0,45 µm, se 65 puede lavar con ácido aurintricarboxílico 10-200 mM, se puede digerir con lisis y la inactivación con ADNasa y/o la inactivación de la endonucleasa y se puede purificar.

ES 2 325 445 T3

La digestión de la muestra puede incluir las etapas de 12,5-25 mg de proteinasa K, SDS 1-1,5%, ácido aurintricarboxílico 10-200 mM y regulador de citrato de sodio 10-20 mM, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y eluir el lisado de la superficie del filtro mediante la adición de isotiocianato de guanidina 3,5-4,2 M, pH 6,4.

5 Las soluciones se pueden aplicar directamente a un dispositivo biosensor en el que, respondiendo a la presencia de los patógenos en la muestra de sangre, el paciente desarrolla marcadores de estado de enfermedad patogénicos o nativos que permiten la captura y detección de estos marcadores mediante el dispositivo biosensor. Alternativamente, la solución se puede aplicar directamente a un dispositivo de espectrometría de masas cromatográfico en el que, respondiendo a la presencia de los patógenos en la muestra de sangre, el paciente desarrolla marcadores de estado de enfermedad patogénicos o nativos que permiten la detección de fracciones de masa asociadas con los componentes estructurales de los patógenos utilizando el dispositivo de espectrometría de masas.

10 El regulador puede comprender detergente y sales. Esto se puede conseguir ayudando a la solubilización del elemento de sangre introduciendo fosfato de potasio 10-30 mM a un intervalo de pH de 7,8 a 8,0, impulsando la actividad de fosfolipasa A₂ mediante la adición de cloruro de magnesio 10-80 mM como catión divalente, añadiendo 20-150 mM de cloruro de sodio e incluyendo ácido aurintricarboxílico 10-200 mM durante el procedimiento de incubación de la ADNasa. El regulador puede incluir asimismo Tritón X-100 1,0-1,2%. Las etapas adicionales pueden incluir la combinación de 6-O-(N-heptilcarbamol)- α -D-glucopiranósido de metilo 20-35 mM y saponina 0,05-0,1%; y almacenar las enzimas utilizando un regulador de trehalosa. El almacenamiento de las enzimas se lleva a cabo utilizando un 15 regulador de trehalosa en combinación con 6-O-(N-heptilcarbamol)- α -D-glucopiranósido de metilo. El regulador de almacenamiento de trehalosa comprende fosfato de potasio 10 mM, Tritón X-100 al 0,01-0,04%, ditiotreitol 1-5 mM y trehalosa 0,3-0,5 M.

20 En la figura 1, se lleva a cabo una extracción de sangre (30) en un paciente. Se añade una solución de PBS, pH 7,4 y Tritón X-100 1,2%, la sangre se somete al vórtice y se centrifuga (40) creando un gránulo (60) en un tubo de 15 ml (50). Preferentemente, las resinas, los hidróxidos de metal y/o los nanomateriales se pueden añadir con una solución de PBS/Tritón X-100 para capturar partículas tales como bacterias, virus, hongos, células cancerosas, priones, toxinas y similares para contribuir a aumentar la densidad de estas partículas. El incremento en la densidad de partícula permite 25 disminuir velocidades inferiores para llevar a cabo la centrifugación.

30 El sobrenadante se decanta dejando un agregado de fibrina. Se añade un reactivo de lisis de fibrina (70) de la presente invención a un tubo (50) para disolver el agregado de fibrina y dejar los patógenos (65) expuestos para el análisis. Los patógenos (65) se someten al vórtice, centrifugan y se someten a la lisis para extraer el ADN patógeno. Se replica a continuación el ADN (90) y se analiza (100) para encontrar la identidad del patógeno sospechoso.

35 En una forma de realización alternativa de la presente invención, se utilizaría un dispositivo para obviar la necesidad de una centrífuga. El dispositivo utilizará electrodos flexibles similares a una agalla de pez para recoger partículas (tales como bacterias, virus, células cancerosas, priones o toxinas). Los electrodos se utilizarán asimismo para recoger resinas y los nanomateriales que poseen estas partículas unidas a ellos. El dispositivo será similar a una burbuja sobre 40 una superficie. Se utilizará un potencial eléctrico para acelerar la captura de patógeno. El dispositivo se puede comprimir para permitir retirar de manera eficiente de los contenidos. El dispositivo tendrá preferentemente las propiedades siguientes: (1) una capa de base rígida y una capa superior flexible; (2) agallas flexibles para ser montadas sobre la capa superior o la capa inferior; (3) las cepas de estreptavidina y ácido hialurónico funcionalizadas con péptidos bioactivos, 45 anticuerpos, aptómeros, polímeros impresos molecularmente o metales que atraen partículas tales como bacterias, virus, hongos, toxinas, marcadores metabólicos, marcadores de estado de enfermedad o agentes químicos que se van a depositar sobre los electrodos de agalla flexibles; (4) la capa flexible tendrá electrodos depositados sobre ella; (5) los electrodos auxiliares para los electrodos de agalla que residirán sobre el lado opuesto; (6) el volumen de muerte promedio del dispositivo es 300 microlitros- se prefiere que no exista material residual en el dispositivo después de 50 exprimir el material del dispositivo; y (7) la poliimida formará la porción flexible y los electrodos serán realizados en Pt, Au, o carbón. El dispositivo se utiliza preferentemente como se expone a continuación: (1) fluye líquido en el dispositivo y en este momento se aplica el voltaje; (2) se añaden los productos químicos y se calienta el dispositivo; y (3) se exprime el dispositivo para eliminar todos los contenidos. El dispositivo se utiliza para preparar una muestra para el análisis de partículas (tales como bacterias, virus, células cancerosas, priones o toxinas) utilizando sistemas de detección basados en espectrofotometría, espectroscopía de masa, anticuerpos, cultivo o ácido nucleico (por ejemplo, 55 PCR, NASBA, TMA).

60 Se puede utilizar un dispositivo de filtrado para filtrar las partículas a partir de sangre tratada con soluciones de Tritón X-100/PBS/magnesio con enzimas seleccionadas de entre el grupo constituido por estreptocinasa, plasminógeno, fosfolipasa A₂, ADNasa y lipasa. Se puede utilizar asimismo un dispositivo de filtrado para filtrar las partículas a partir de sangre tratada con una combinación de 6-O-(N-heptilcarbamol)- α -D-glucopiranósido de metilo, saponina, y PBS/magnesio más enzimas seleccionadas de entre el grupo constituido por estreptocinasa, plasminógeno, fosfolipasa A₂, ADNasa y lipasa. Después de eliminar mediante lavado los reactivos del tratamiento de enzima y de detergente y cualquier componente de sangre escindido residual, la partícula está lista para el análisis o para un tratamiento adicional.

65 La preparación de una forma de realización de un reactivo de lisis de fibrina se representa como protocolo 1 en la figura 2 en la que se añaden NaCl, MnCl, DTT, ADNasa y plasminógeno a un tubo de mezcla (110). Se añade a continuación el fosfato de sodio al tubo de mezcla (110) y la solución se distribuye en tubos de reactivo de 1,5 ml

ES 2 325 445 T3

(120) colocados en hielo. Los tubos de reactivo (120) se congelan a -75°C durante aproximadamente (20) minutos. Se añaden aproximadamente 2.700 U de estreptocinasa (130) a la pared de los tubos de reactivo (120) justo por encima de la solución de plasminógeno congelado.

5 Las figuras 3-6 proporcionan los resultados PCR derivados de las muestras de sangre ensayadas cultivadas con *Bacillus anthracis* no virulento vegetativo encapsulado que crecieron según un protocolo CDC # CDC.DFA.1.2, almacenado en glicerina TSB al 15% y congelado a -75°C. Las cepas de *Yersinia pestis* no virulentas crecieron en TSB a 37°C, se congelaron en glicerina TSB al 15% a -75°C. Los contajes bacterianos se ensayaron en el tiempo de cosecha y se reensayaron en el tiempo de la siembra de la muestra.

10 15 Los números para el promedio de *Bacillus anthracis* CFU por seis ml de sangre humana se derivan del ensayo después de congelar dada la gran desviación estándar encontrada en los casos de dilución posteriores a la congelación uno junto a otro. No se reconoció o esperó muerte celular significativa. Una velocidad de muerte celular del 30% es la más elevada que razonablemente se espera en la peor de las circunstancias. Un enfoque conservador sería incrementar todos los *Bacillus anthracis* CFU en un 30%.

20 25 Los números para el promedio de *Yersinia pestis* CFU por seis ml de sangre se derivan del ensayo anterior a la congelación. La baja desviación estándar del conteo de replicados antes de la congelación y la concordancia con el ensayo después de congelar permite la utilización de los números de conteo de bacterias antes de congelar. Esto es un enfoque conservador que se puede utilizar dado los resultados ahora predecibles que se derivan del almacenaje y de la dilución de este organismo.

30 35 La presente invención genera de forma reproducible analitos de ADN adecuados para el ensayo de PCR de patógenos, tales como *Bacillus anthracis*, utilizando muestras de sangre de pacientes que tienen hasta 3 meses de vida. La sensibilidad es 100% a <10 CFU/ml de sangre humana cuando se utilizan 6 ml de sangre recogida en un vacutainer Becton Dickinson (tablas 1 y 2). Este protocolo permite asimismo la detección al 100% de sensibilidad de *Yersinia Pestis* a < 10 CFU/ml durante por lo menos uno de los cuatro conjuntos de oligos según los datos más limitados recogidos para este organismo (tabla 3). Se debería indicar que la CDC no considera muestras positivas para *Y. pestis* a menos que dos conjuntos de oligos produzcan una señal PCR aceptable.

40 45 Según el protocolo 1, la figura 7 muestra un procedimiento preferido de montaje de los reactivos de extracción según la presente invención. Las figuras 8-9 muestran un procedimiento de recuperación bacteriana y la lisis de fibrina según la presente invención. Las figuras 10-13 muestran un procedimiento preferido de lisis bacteriana y extracción de ácido nucleico según la presente invención.

50 55 En una forma de realización alternativa, según se muestra en las figuras 14-16b, las enzimas individuales de la estreptocinasa y el plasminógeno están constituidos por polvos secos, mezclados, distribuidos a continuación en tubos de un solo uso. En otra forma de realización, la fosfolipasa A₂, plasminógeno, ADNasa o endonucleasa, y la lipasa se suspenden y se secan en gránulos de regulador de trehalosa. Aunque resulta preferida la fosfolipasa A₂, se puede utilizar cualquier enzima que destruya la membrana nuclear mientras se mantengan la pared celular bacteriana o el revestimiento viral intactos. La estreptocinasa se suspende asimismo y se seca en gránulos de regulador de trehalosa. Por lo menos un gránulo del plasminógeno y un gránulo de la estreptocinasa se acondicionan en tubos como reactivos secos.

60 65 Los reactivos secos de la presente invención se pueden resuspender en una solución de regulador de 10 ml que comprende aproximadamente fosfato de potasio 10-30 mM, cloruro de magnesio aproximadamente 10-80 mM, cloruro de sodio aproximadamente 20-150 mM, ácido aurintricarboxílico aproximadamente 10-200 mM y Tritón X-100 aproximadamente 1,0-1,2%. Resulta evidente que el ácido aurintricarboxílico proporciona un nivel de protección al ácido nucleico bacteriano sin impedir la digestión del ADN humano. No se describe la utilización de ácido aurintricarboxílico en los procedimientos anteriores de la digestión de ADN humano. El 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo y la saponina se pueden sustituir por Tritón X-100. En una forma de realización, el 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo se utiliza a 20-35 mM y la saponina se utiliza a una concentración de 0,05-0,19. El 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo se almacena con fosfolipasa A₂, plasminógeno, ADNasa I y lipasa en un regulador de almacenamiento de trehalosa. La sustitución de Tritón X-100 por 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo y la solución de saponina permite la actividad eficaz de la fosfolipasa A₂, proporciona la acción de rotura de los agregados de proteína sin desnaturizarse y es más adecuada para las paredes bacterianas que el Tritón X-100. La utilización de saponina y de 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo en esta combinación no se describe en la técnica anterior. El regulador de almacenamiento de trehalosa puede comprender fosfato de potasio 10 mM pH 7,4, Tritón X-100 o 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo 0,01-0,04%, ditiotreitol 1-5 mM y trehalosa 0,3-0,5. El regulador y la mezcla de enzima se combinan inmediatamente a continuación con una muestra de sangre de 10 ml, que se puede escalar hacia 1 ml. La muestra se incuba a continuación a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Los componentes mencionados anteriormente ayudan a la solubilización del elemento de la sangre mediante la minimización de ciertos particulados que de otra manera colmatarían los filtros, dañarían los biosensores o los dispositivos de espectrometría de masas e impedirían la extracción de ácido nucleico. La solubilización ocurre mientras el ADN humano se digiere eficazmente y el ADN viral y/o bacteriano permanece intacto.

ES 2 325 445 T3

Según los protocolos 2 y 4, una combinación de enzimas preferida comprende estreptocinasa, plasminógeno, ADNasa o endonucleasa, fosfolipasa A₂ y lipasa. De forma alternativa, se pueden utilizar asimismo las combinaciones de enzimas que comprenden estreptocinasa, plasminógeno, ADNasa o endonucleasa y fosfolipasa A₂. En otra forma de combinación alternativa, se pueden utilizar la estreptocinasa, el plasminógeno, la ADNasa o la endonucleasa, además 5 de la ADNasa o la endonucleasa, la fosfolipasa A₂ y la lipasa. La ADNasa o la endonucleasa en combinación con la fosfolipasa A₂ es todavía otra alternativa. La eficacia de las tres últimas combinaciones se descubrió que era igual.

Según el protocolo 3, una combinación de enzimas preferida es la compuesta de estreptocinasa, plasminógeno, ADNasa o endonucleasa, fosfolipasa A₂ y lipasa. Alternativamente, se pueden utilizar las combinaciones de enzimas 10 que comprenden estreptocinasa, plasminógeno, ADNasa o endonucleasa y fosfolipasa A₂. En otra combinación alternativa, se pueden utilizar la estreptocinasa, plasminógeno, la ADNasa o la endonucleasa.

Como se representa en la figura 14 con el protocolo 2, la muestra se centrifuga durante un periodo de aproximadamente 20 minutos a 5.000-5.500 x g a una temperatura entre 10-22°C después de la incubación. El sobrenadante se 15 decanta a continuación y se lava el gránulo tres veces con una solución de Ecotine 10-20 mM/HEPES 20 mM, pH 7,7 y/o una solución de sacarosa 20-30 mM/HEPES 20 mM, pH 7,7.

Alternativamente después de la incubación, la muestra del protocolo 2 se centrifuga de una forma similar y se decanta el sobrenadante, seguido de una lisis de muestra y la inactivación de la ADNasa o de la endonucleasa utilizando 20 aproximadamente 12,5-25 mg de proteinasa K, dodecilsulfato de sodio (SDS) aproximadamente 1-1,5%, ácido aurintricarboxílico aproximadamente 10-200 mM y regulador de citrato de sodio aproximadamente 10-20 mM, pH 7,8-8,4. La muestra se deja incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. A continuación se puede aplicar a la muestra digerida cualquier procedimiento de extracción de ácido nucleico comercializado representado en la figura 14b.

25 Todavía en otra alternativa, a la que se hace referencia como protocolo 3 y representada en la figura 15, la muestra se filtra con una unidad de filtro de 0,22-0,45 μ m y se lava con 10-20 ml de ácido aurintricarboxílico aproximadamente 10-200 mM, seguido de una lisis de muestra y la inactivación de la ADNasa o de la endonucleasa. La lisis de muestra y la inactivación de la ADNasa o de la endonucleasa se lleva a cabo utilizando aproximadamente 12,5-25 mg de 30 proteinasa K, SDS aproximadamente 1-1,5%, ácido aurintricarboxílico aproximadamente 10-200 mM y regulador de citrato de sodio aproximadamente 10-20 mM. La muestra se incuba a continuación a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. La adición de isotiocianato de guanidina 3,5-4,2 M, pH 6,4 es necesaria para eluir el lisado a partir de la superficie de filtro. El extracto de ácido nucleico se puede purificar a continuación utilizando un procedimiento comercializado.

35 Otra alternativa, a la que se hace referencia como protocolo 4 y que se muestra en la figura 16a, aplica la muestra directamente a un dispositivo biosensor que capturará y detectará bacterias, virus, hongos, toxinas, priones, agentes químicos, marcadores metabólicos o marcadores de estado de enfermedad nativos desarrollados por el propio cuerpo del paciente en respuesta a estos patógenos y a los agentes presentes en la muestra de sangre.

40 En todavía otra alternativa del protocolo 4 representada en la figura 16b, la muestra se aplica directamente a un dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía líquida que detectará las fracciones de masa de los componentes estructurales que comprenden bacterias, virus, toxinas, priones y agentes químicos presentes en la muestra de sangre o marcadores de estado de enfermedad nativos desarrollados por el propio cuerpo de los pacientes en respuesta 45 a estos patógenos y agentes presentes en la muestra de sangre.

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar materiales y procedimientos que se pueden utilizar para retirar selectivamente ATA de una muestra, tal como una muestra de sangre que contiene ácido nucleico. De forma típica, ATA se utiliza en los procedimientos para la extracción y para la purificación de ARN de células, virus, etc., 50 debido a su actividad como inhibidor de la ribonucleasa. En una forma de realización de la presente invención reivindicada, el potente inhibidor de la ribonucleasa ATA estará presente durante la parte del procedimiento de extracción de ácido nucleico en la que se permite que la hidrólisis de proteína siga en condiciones óptimas (es decir, con ATA y sales caotrópicas tales como tiocianato de guanidina). Las composiciones para retirar ATA se pueden proporcionar en forma de solución o en forma sólida seca. Preferentemente, se proporcionan las composiciones en una forma sólida 55 seca a las que se añade posteriormente un líquido o fluido. En una forma de realización ejemplificativa, se utiliza una composición de la presente invención en combinación con los reactivos de lisis descritos en la presente memoria.

En una forma de realización, un procedimiento de la presente invención que comprende poner en contacto una muestra que comprende ATA y, opcionalmente, ácido nucleico, con una composición de urea/DTPA de la presente 60 invención. En una forma de realización, la muestra puede comprender cualquier combinación de reactivos tales como los descritos en un regulador de lisis de la presente invención. Una composición de urea/DTPA de la presente invención se puede preparar mediante la combinación de urea con DTPA y opcionalmente EDTA, citrato de sodio, y bastante de una base, tal como hidróxido de sodio para conseguir pH 8,0 según se ha definido en la tabla 1. En una forma de realización, la mezcla se calienta aproximadamente a una temperatura superior a 600°C durante aproximadamente 4 horas, se seca, se molitura hasta polvo y se combina opcionalmente con proteinasa K y 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo. El reactivo de urea/DTPA se proporciona preferentemente en una forma seca de forma que minimice los volúmenes de muestra de secuencia corriente abajo y obvie el procedimiento que consiste en añadir la proteinasa K (PK) en una etapa separada (ya que PK no es estable durante largos períodos de tiempo en urea de 6,0 a 65

7,5 M). El reactivo urea/DTPA molido se seca al vacío y se añade (a 360 mg/ml de la muestra de sangre) a la sangre tratada anteriormente con los reactivos de lisis descritos en la presente memoria. La muestra tratada con urea/DTPA se incuba aproximadamente 5-10 minutos a aproximadamente 65°C. Cuando las muestras tratadas con ATA y un reactivo de urea/DTPA de la presente invención se combinan con los protocolos de extracción de ácido nucleico de la técnica anterior en los que las matrices de unión tales como sílice u otros materiales que unen los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas o en las que se utiliza la precipitación y la centrifugación, el ATA no se copurificará con el extracto de ácido nucleico. En todavía otra forma de realización, la proteinasa K se puede inactivar mediante la exposición a temperaturas superiores a aproximadamente 80°C durante 5-10 minutos o más, la muestra se enfriará a continuación por debajo de aproximadamente 40°C, a la que a continuación se añade ureasa a aproximadamente 1.000-100.000 U/ml para escindir la urea. La muestra a continuación se puede aplicar directamente a un dispositivo de matriz de ácido nucleico.

Utilizando los procedimientos objetivo en conjunción con PCR, se pueden detectar *Bacillus anthracis* 10 CFU por 10 ml de sangre. Asimismo, no hubo diferencia en la cinética RT-PCR derivada de las muestras de PBS en las que se sembró 1 ng de MS2 ARN en extractos de ácido nucleico preparados con y sin ATA. Asimismo, se detectaron 1.000 pfu del virus de la polio sabin III/8 ml de SPS de sangre completa mediante RT-PCR cuando los reactivos de lisis descritos en la presente memoria se combinaron con el reactivo urea/DTPA y el protocolo descrito anteriormente. Mediante la utilización de un reactivo urea/DTPA de la presente invención, el ATA que estaba presente antes de la etapa de la digestión de la proteinasa K no tuvo un impacto negativo sobre la cinética PCR utilizando los extractos de ácido nucleico que se prepararon utilizando los procedimientos objetivo.

25	Tabla 1. Contenidos de reactivo en polvo urea/DTPA (tras la adición de 1 ml de muestra a 360 mg de reactivo)
	Urea 6,0-7,5 M
	6-O-(N-heptilcarbamoyl)-α-D-glucopiranósido de metilo 10-20 mg/ml
	Proteinasa K 600 - 1.000 μg/ml
30	EDTA 20 - 70 mM
	DTPA 20 - 70 mM
	Citrato de sodio 120 mM
	Añadir hidróxido de sodio hasta pH 8,0

35 En otra forma de realización, si una muestra no se trata junto con los reactivos de lisis, tales como los descritos en la presente memoria, se puede añadir a las células a continuación un regulador que comprende solo ATA como una primera etapa y tratarse posteriormente según se ha descrito anteriormente.

40 En otra forma de realización, se puede añadir la urea hasta aproximadamente 6,0-7,5 M a una muestra que contiene ATA, y a continuación combinar con los reguladores de unión y matrices de unión de sílice basados en la sal caotrópica de la técnica anterior, llevar a cabo el protocolo según la cita de la literatura o las especificaciones del fabricante con la excepción de calentamiento del regulador de unión y de lavado basados en la sal caotrópica hasta aproximadamente 55-65°C antes de utilizarlo con la muestra. La reacción de urea con el ácido aurintricarboxílico (ATA) más la combinación de esta solución con la sal caotrópica a aproximadamente 55-65°C seguida de la aplicación a una matriz de captura de ácido nucleico basada en sílice permite la unión selectiva de ácido nucleico a la matriz y la exclusión de ATA (que ha salido a través del flujo de la columna). Es la combinación de la reacción con urea y el calor la que proporciona la exclusión de ATA a partir de la matriz de captura de sílice mientras el ácido nucleico se une fácilmente. El reactivo urea/DTPA descrito anteriormente producido mediante calentamiento superior a 600°C durante la producción elimina la necesidad de esta etapa de calentamiento de sal caotrópica y permite una mejor eliminación del ATA.

55 En otra forma de realización, las muestras de sangre se pueden tratar con ATA que contiene mezclas descritas en la presente memoria en combinación con la captura de patógeno utilizando péptidos bioactivos funcionalizados en ácido hialurónico asimismo descrito en la presente memoria en el que el ácido hialurónico a su vez actúa como guíaonda polimérica. El ácido hialurónico se marca con biotina vía los grupos carboxilos o aminas y el exceso de biotina no ligado se elimina posteriormente vía diáisisis. La estreptavidina se reticula y el exceso reticulado no unido se elimina vía diáisisis. Se añade la estreptavidina reticulada en 100-10.000 de exceso molar al ácido hialurónico biotinilado y se incuba aproximadamente 4-10 horas con o sin campo electroforético o dielectroforético aplicado. Alternativamente, se añade estreptavidina en las proporciones descritas, se incuba durante aproximadamente 1-4 horas agitando, se combina con reactivo de reticulación fotoactivado y se reticula dentro como un sistema de litografía para generar estructuras posicionadas dentro de una ruta de flujo de muestra. En este sistema la liberación de calcio en el sitio de la captura de patógeno vía péptido bioactivo o apareamiento de especies de ARN se produce en presencia de trombina (aproximadamente 10-500 μ g por mililitro) utilizada para desencadenar la conversión local del fibrinógeno marcado en la molécula informadora (aproximadamente 10-500 μ g por mililitro) en un agregado de fibrina insoluble en el sitio de la captura de patógeno mediante un péptido bioactivo o el apareamiento de las especies de ARN sobre la matriz de la guíaonda polimérica del ácido hialurónico. Las moléculas informadoras pueden ser cualquier molécula que se pueda detectar e incluir, por ejemplo, moléculas fluorescentes (fluoresceína, etc.), moléculas radioactivas, enzimas,

ES 2 325 445 T3

antígenos y similares. Tal como se utiliza en la presente memoria, los péptidos bioactivos incluyen péptidos unidos a virus nativos y modificados no específicos de forma más óptima, tales como lactoferrina o lactoferrina modificada con ácido graso, y péptidos unidos a bacterias nativas y modificadas no específicas, más óptimamente, tales como Cecropina P1, pero también incluyen, por ejemplo, protamina, Buforina I, Buforina II, Defensina, D-Magainina II, 5 Cecropina A, Cecropina B, Lectina PA-1 y tripticina. Los péptidos modificados se pueden alterar en términos de contenido de aminoácido e incluyen las sales, ésteres, amidas y formas aciladas de las mismas.

En otra forma de realización, los péptidos bioactivos funcionalizados sobre el ácido hialurónico (que se reticula vía 10 biotina y estreptavidina) actúan como mitades captadoras de patógeno. Tras la captura del patógeno o del biomarcador, el ácido hialurónico se escinde utilizando aproximadamente 1.000-1.000.000 unidades de hialuronidasa/ml de muestra dentro del dispositivo.

En otra forma de realización, se combinan el ATA, el cloruro de magnesio y los componentes de fosfato de potasio descritos en el regulador de lisis de la presente invención se llevan hasta aproximadamente un pH de 9,2-10 en 15 lotes de 100 ml y se calientan a ebullición hasta que se forma un residuo seco. El residuo seco se moltura, se seca adicionalmente al vacío y se añade a otra enzima, detergente y componentes de trehalosa, tales como los descritos en la presente memoria.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la extracción de ácido nucleico de una muestra que comprende ácido aurintricarboxílico (ATA) y una sal caotrópica, que comprende la adición de una composición que comprende urea y dietilentriaminpentaacetato (DTPA) a la muestra antes del aislamiento del ácido nucleico, estando el ácido nucleico libre de ATA.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición comprende además citrato de sodio.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la composición comprende además proteinasa K.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende además 6-O-(N-heptilcarbamoyl)- α -D-glucopiranósido de metilo.
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende además etilendiamintetraacetato.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH de la muestra se lleva a aproximadamente 8,0.
- 20 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende además hidróxido de sodio.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición es un polvo seco.
- 25 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de urea en la muestra es de 6,0 a 7,5 M.
- 30 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra se pone en contacto posteriormente con ureasa.
- 30 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que se añaden 1.000 a 100.000 unidades de ureasa por ml de muestra.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende la etapa previa de calentamiento de una solución que comprende urea y DTPA a por lo menos 600°C.
- 35 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la urea y el DTPA se calientan durante aproximadamente 4 horas.
- 40 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la extracción de ácido nucleico que comprende las etapas de lavado y/o de unión, y la muestra es calentada hasta entre 55 y 65°C durante las etapas de lavado y/o de unión.
- 45 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es sangre.

50

55

60

65

Fig. 1

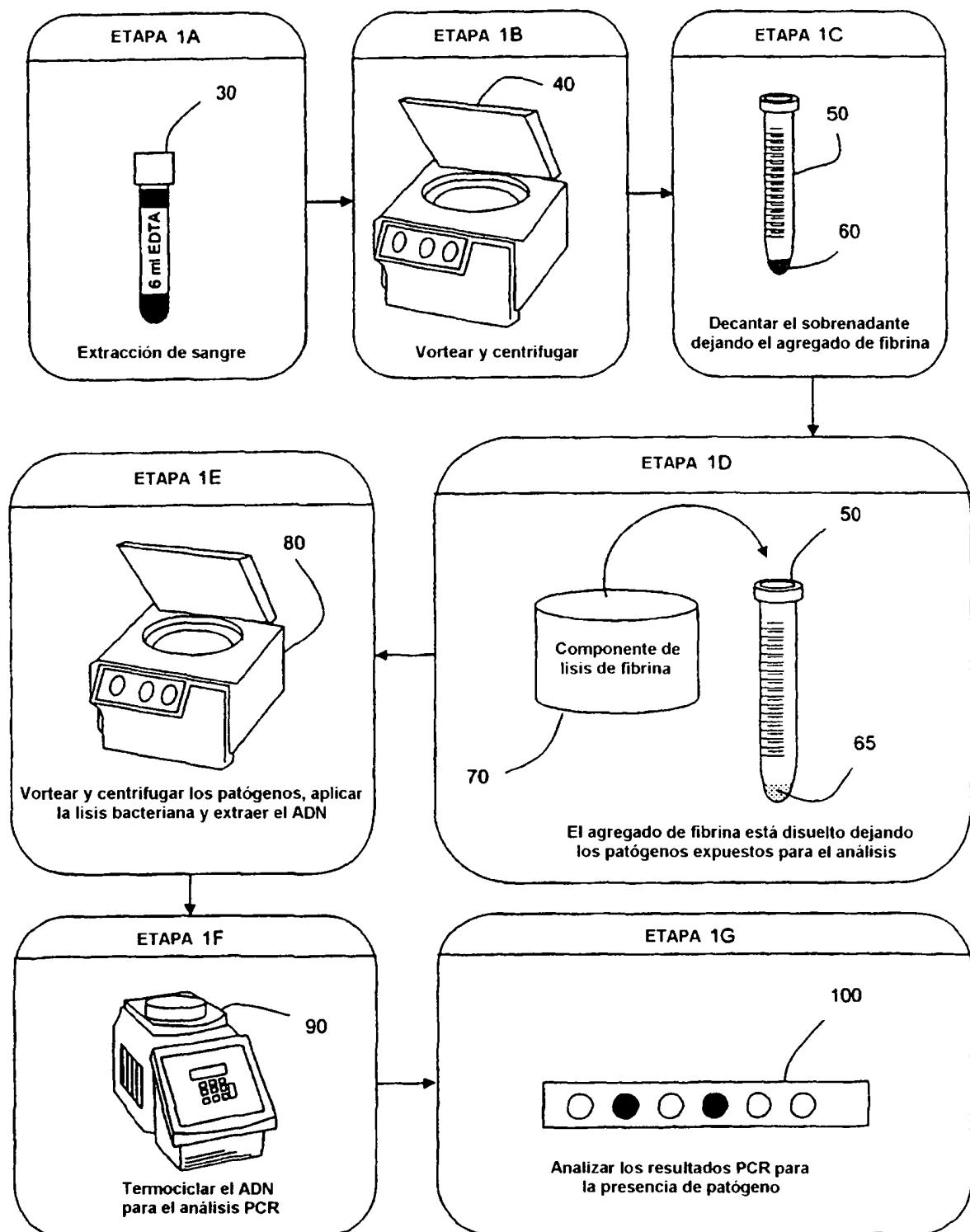


Fig. 2

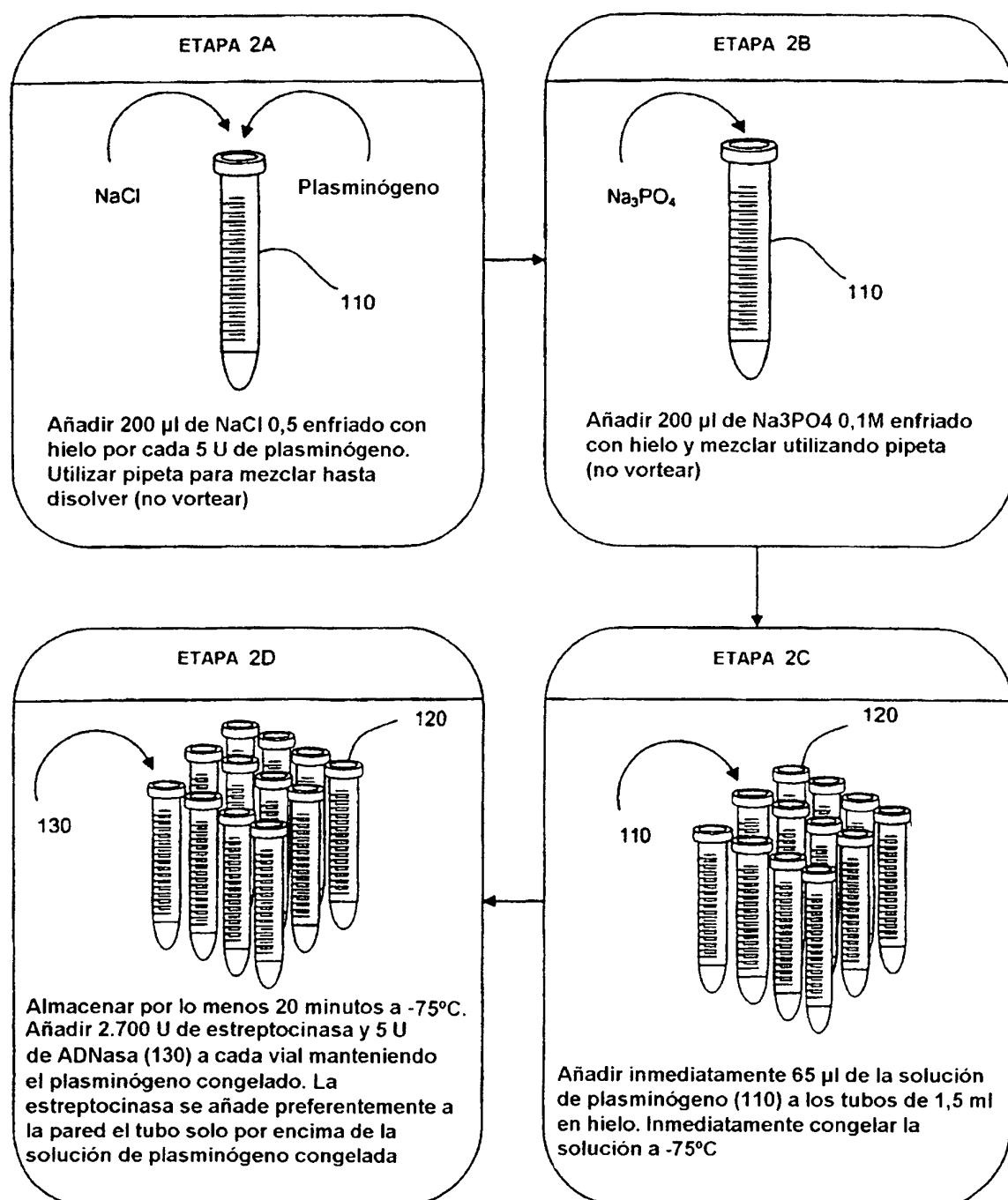


Fig. 3

Grupo de datos de protocolo de sangre de *Bacillus Anthracis*

Número de muestra	Cebador pXO2 / sondas- punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador genómico/ sondas - punto de cruce en el ciclador de luz	CFU calculado en promedio/ 6 ml de sangre	Comentarios sobre el tipo de muestra: todas las muestras ensayadas 2 días después del sembrado
M3200253BA1	36,75	37,76	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA2	36,59	37,86	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA3	35,97	38,10	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA4	37,26	39,53	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA5	35,36	40,11	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA6	36,35	45,19	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA7	36,62	38,64	13,75	Sembrado positivo
M3200253BA8	37,04	39,51	13,75	Sembrado positivo
M320020BA9	0,00	0,00	0,00	Blanco
M/3200226BA1	37,16	39,35	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA2	36,79	40,28	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA3	37,92	39,94	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA4	37,49	40,16	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA5	39,66	40,26	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA6	39,31	41,19	1,38	Sembrado positivo
M/3200226BA7	38,48	40,73	1,38	Sembrado positivo
M/320020BA8	0,00	0,00	0,00	Blanco

Fig. 4

Grupo de datos de protocolo de sangre de *Bacillus anthracis*: comparación de la sangre de dos individuos diferentes y evaluación de la edad de la muestra de la sangre

Número de muestra	Cebador pXO2 / sondas- punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador genómico/ sondas - punto de cruce en el ciclador de luz	CFU calculado en promedio/ 6 ml de sangre	Comentarios sobre el tipo de muestra: todas las muestras ensayadas 84 días después del sembrado
V210253BA1	37,73	39,81	10,5	Donador de sangre 1
V210253BA2	36,74	39,05	10,5	Donador de sangre 1
V210253BA3	36,51	37,99	10,5	Donador de sangre 1
V210253BA4	38,12	39,79	10,5	Donador de sangre 1
V21020BA5	0,00	0,00	0,00	Blanco
M210253BA1	37,86	39,81	2,25	Donador de sangre 2
M210253BA2	37,84	39,22	2,25	Donador de sangre 2
M210253BA3	37,24	38,52	2,25	Donador de sangre 2
M210253BA4	38,68	39,33	2,25	Donador de sangre 2
M21020BA5	0,00	0,00	0,00	Blanco

Fig. 5

Grupo de datos de protocolo de sangre de
Bacillus anthracis: evaluación del protocolo de
 sangre por un departamento del laboratorio de
 salud

Número de muestra	Cebador pXO2 / sondas- punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador genómico/ sondas - punto de cruce en el ciclador de luz	CFU calculado en promedio/ 6 ml de sangre	Comentarios sobre el tipo de muestra: Todas las muestras en el mismo lote como en la tabla 1
M3200256BA1L	38,81	39,93	13,75	Sembrado positivo
M3200256BA2L	36,10	39,26	13,75	Sembrado positivo
M3200223BA3L	36,77	38,58	1,38	Sembrado positivo
M320020BA4L	0,00	0,00	0,00	Blanco

Fig. 6

Grupo de datos del protocolo de sangre de *Yersinia Pestis*

Número de muestra	Cebador YP2/ Sondas- punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador YP9/Sondas -punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador YP12/Sondas punto de cruce en el ciclador de luz	Cebador YP 16/ Sondas-punto de cruce en el ciclador de luz	CFU calculado en promedio/ 6 ml de sangre	Comentarios sobre el tipo de muestra: todas las muestras extraídas 2 días después del sembrado
M3180251EYP1	0,00	0,00	0,00	37,97	12,0	Sembrado positivo
M3180251EYP2	0,00	47,01	0,00	0,00	12,0	Sembrado positivo
M3180251EYP3	41,56	0,00	0,00	40,29	12,0	Sembrado positivo
M3180225EYP4	0,00	0,00	0,00	38,98	24,0	Sembrado positivo
M3180225EYP6	40,20	44,01	39,66	37,60	24,0	Sembrado positivo
M3180251FYP7	0,00	46,15	0,00	39,79	48,0	Sembrado positivo
M3180251FYP8	40,48	43,59	41,70	35,47	48,0	Sembrado positivo
M3180251FYP9	40,20	41,88	38,67	34,23	48,0	Sembrado positivo
M318020YP10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Blanco

Fig. 7

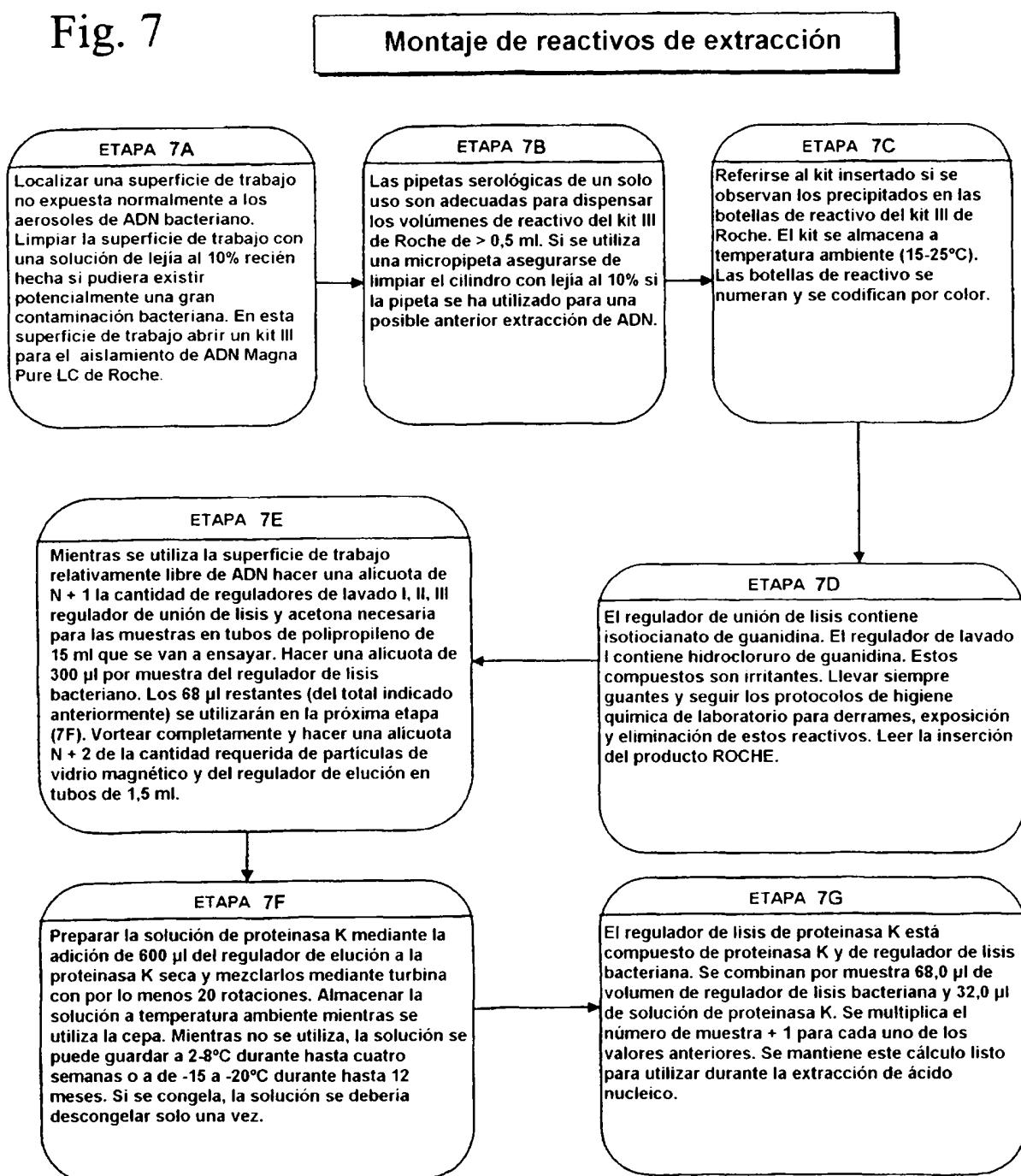


Fig. 8

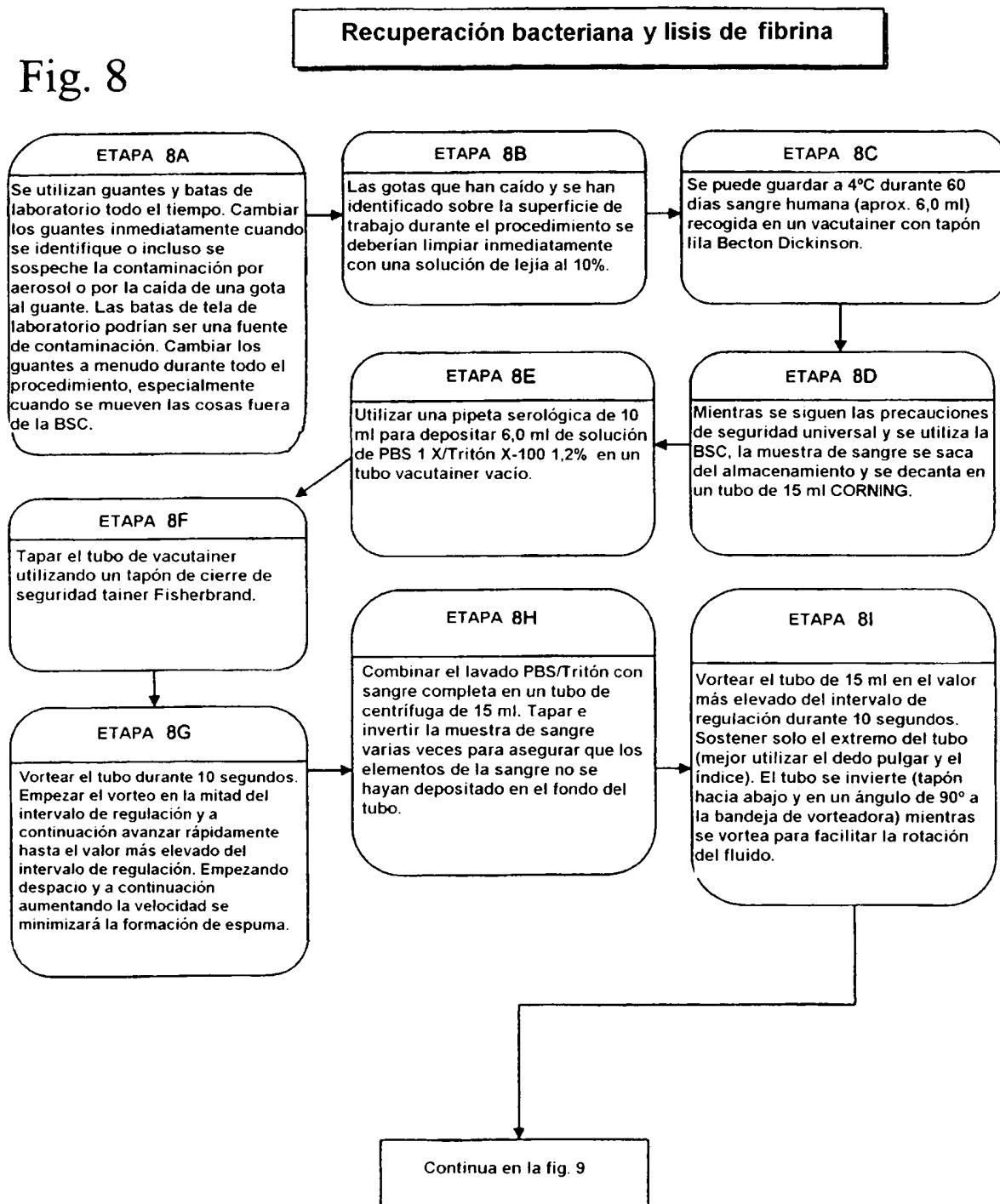


Fig. 9

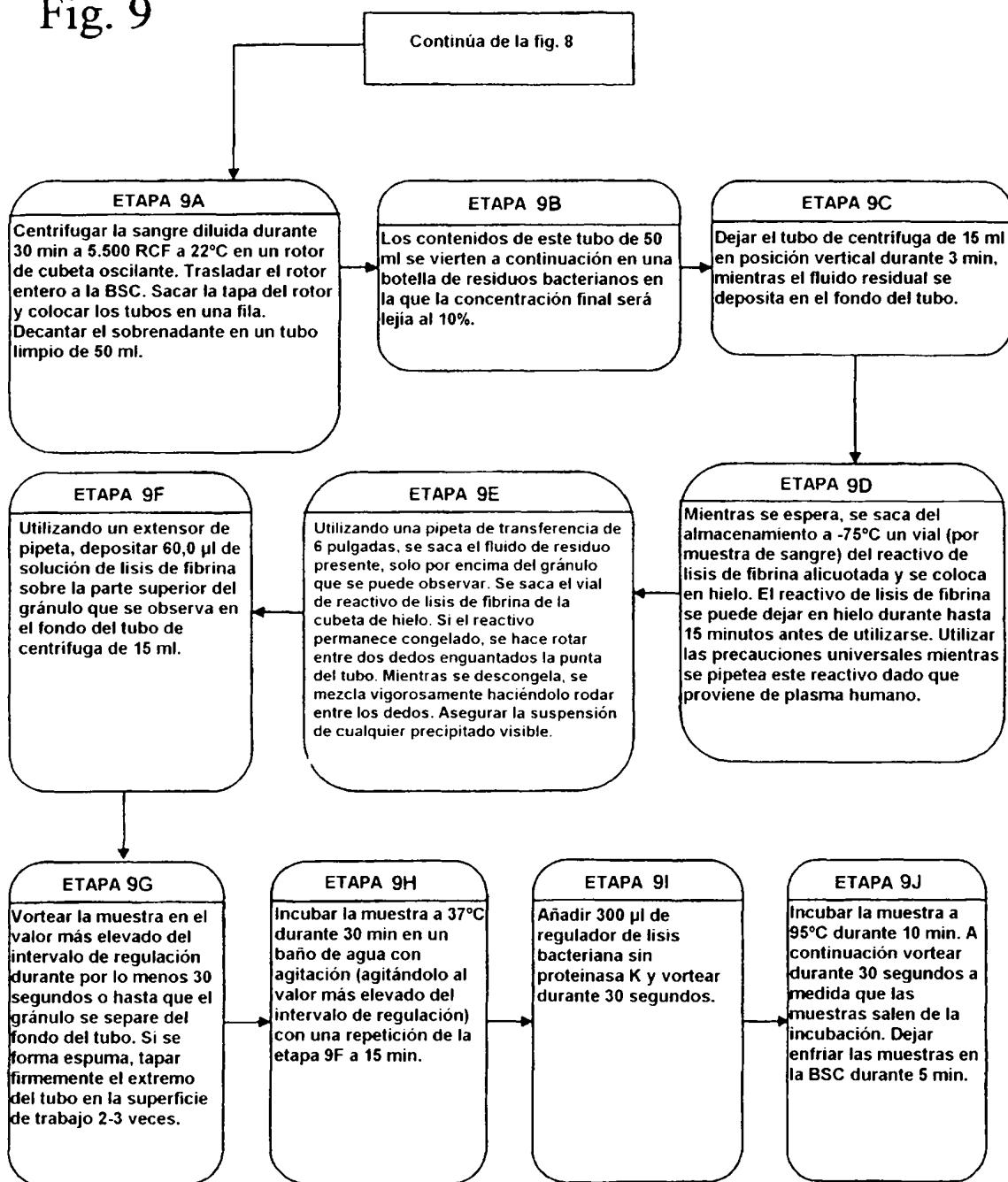


Fig. 10

Lisis bacteriana y extracción de ácido nucleico

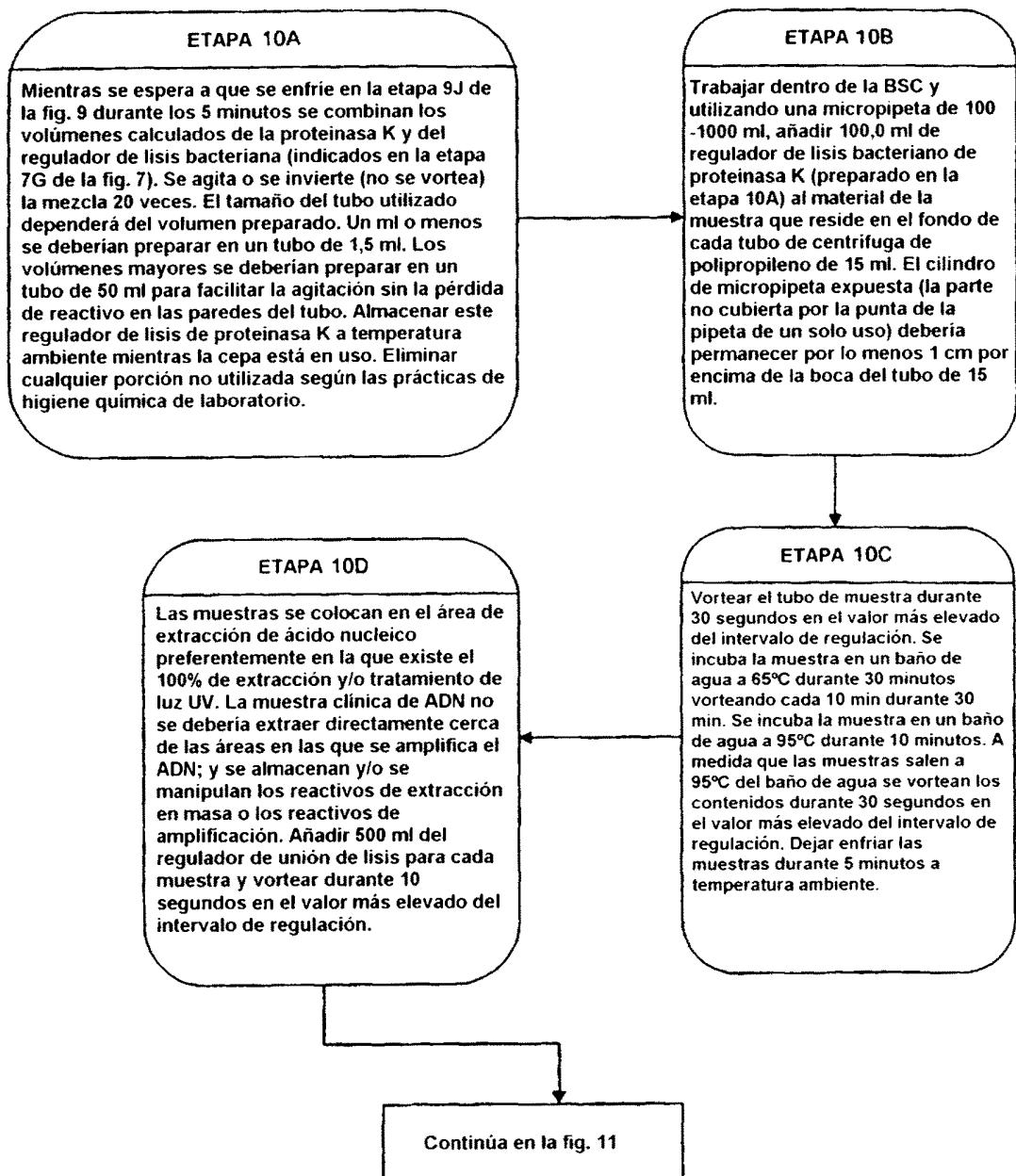


Fig. 11

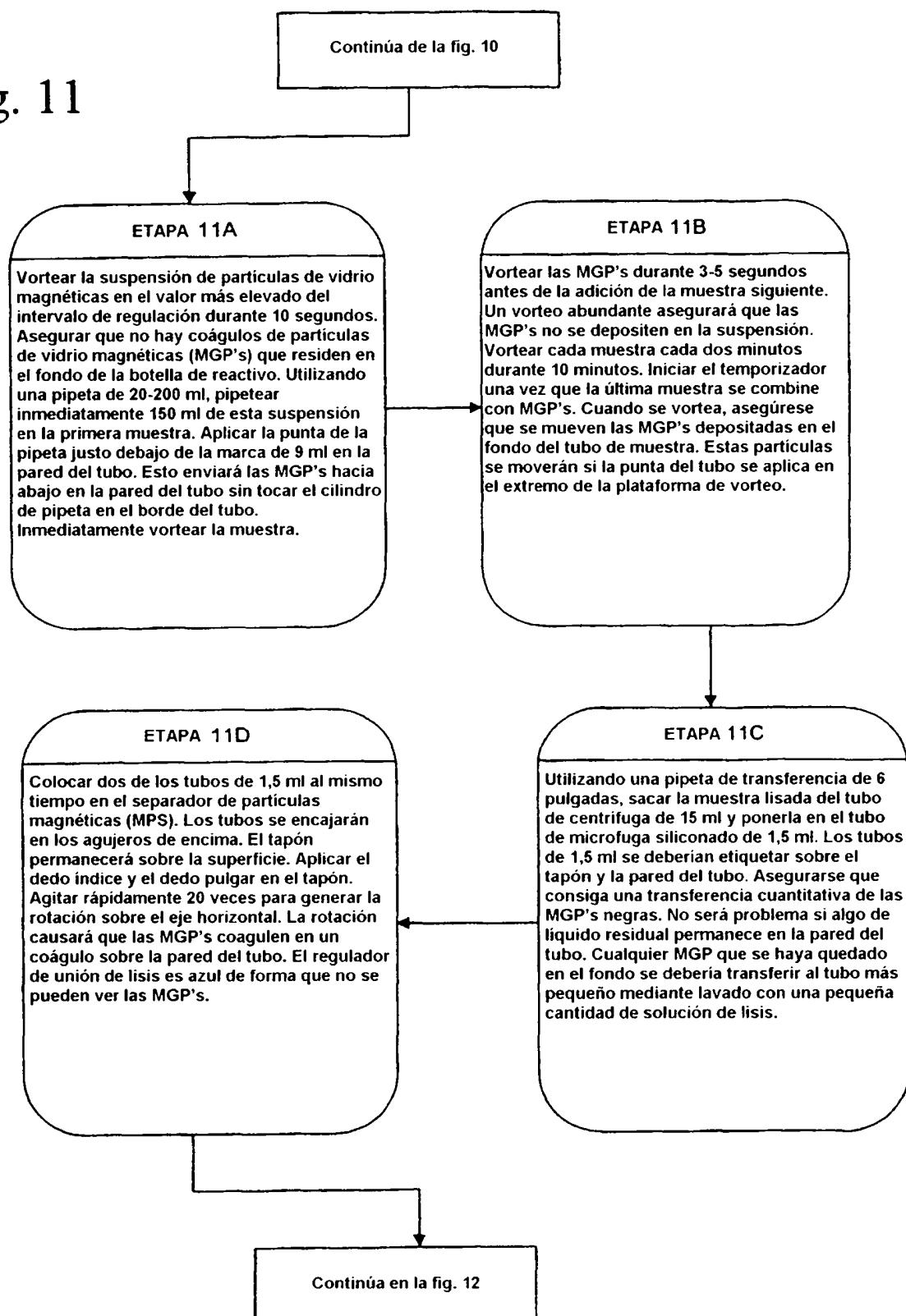


Fig. 12

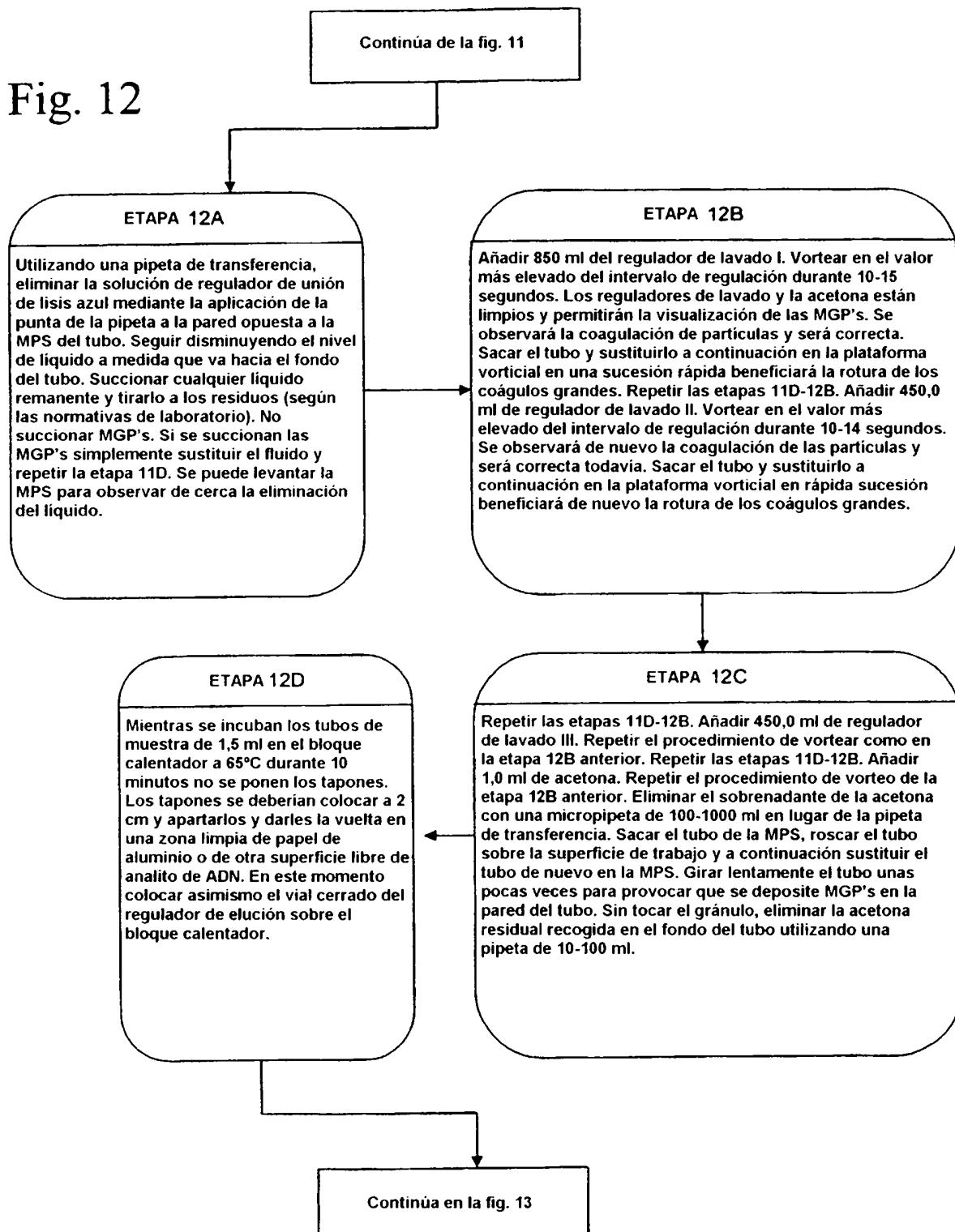


Fig. 13

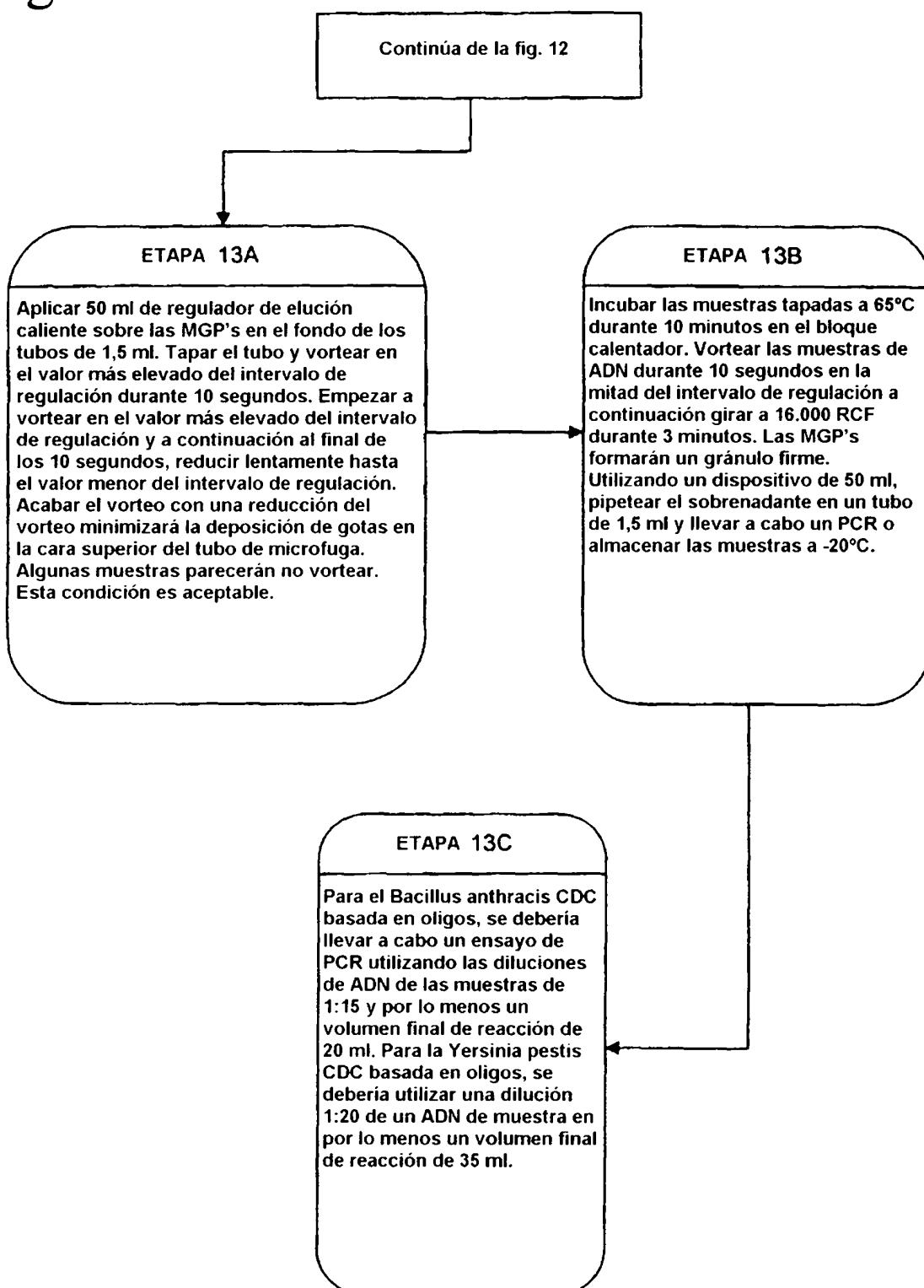


Fig. 14a

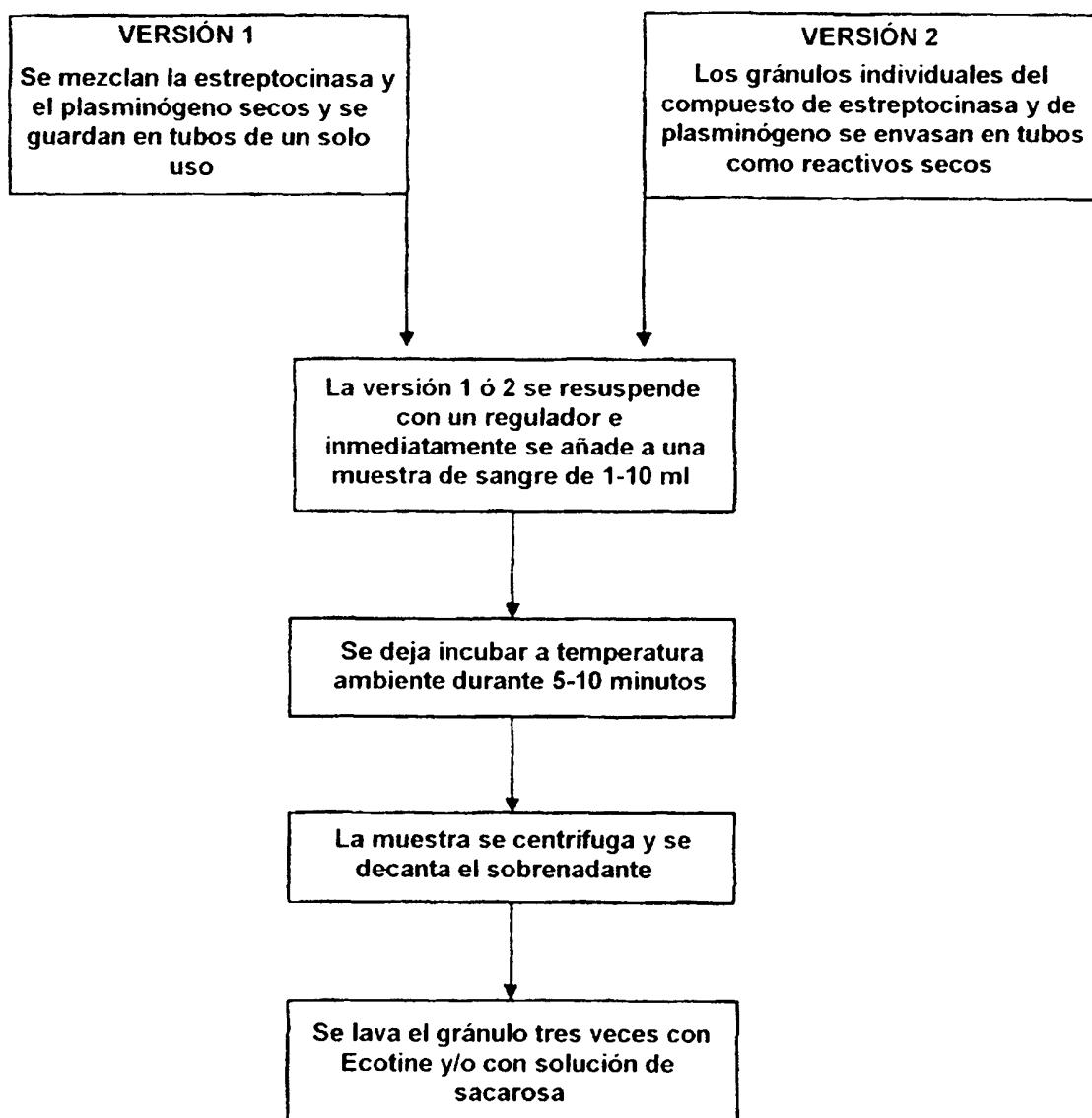


Fig. 14b

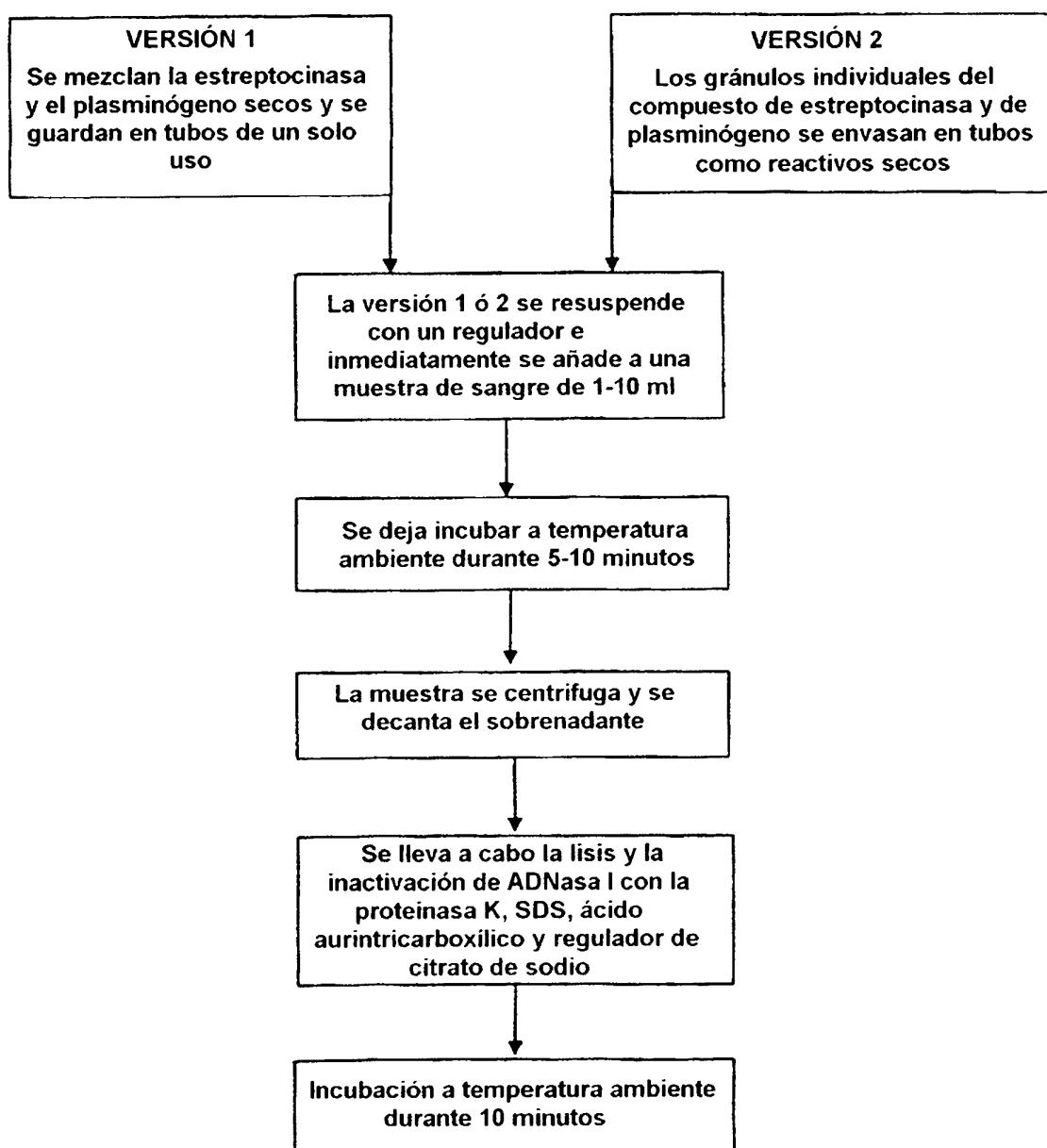


Fig. 15

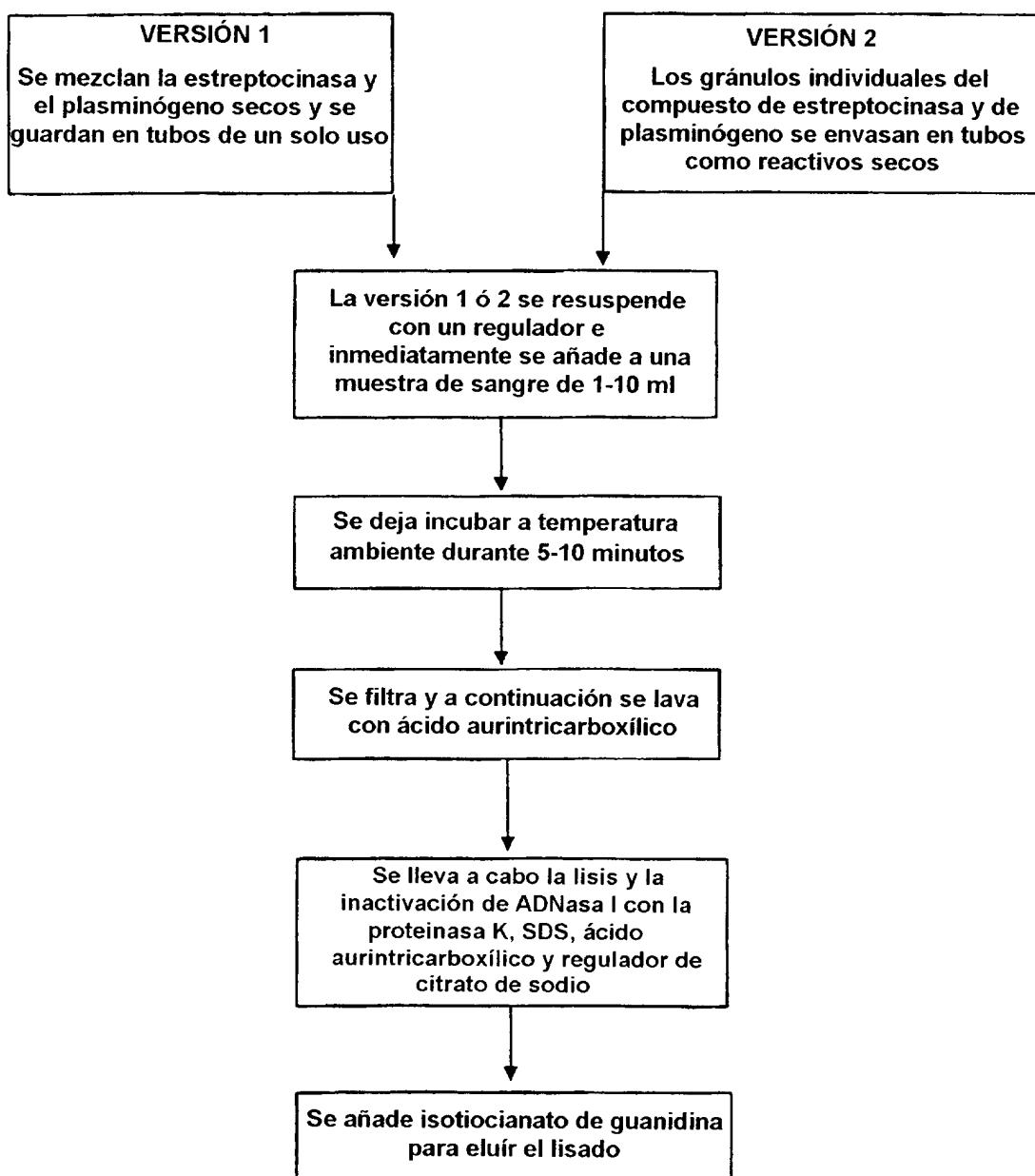


Fig. 16a

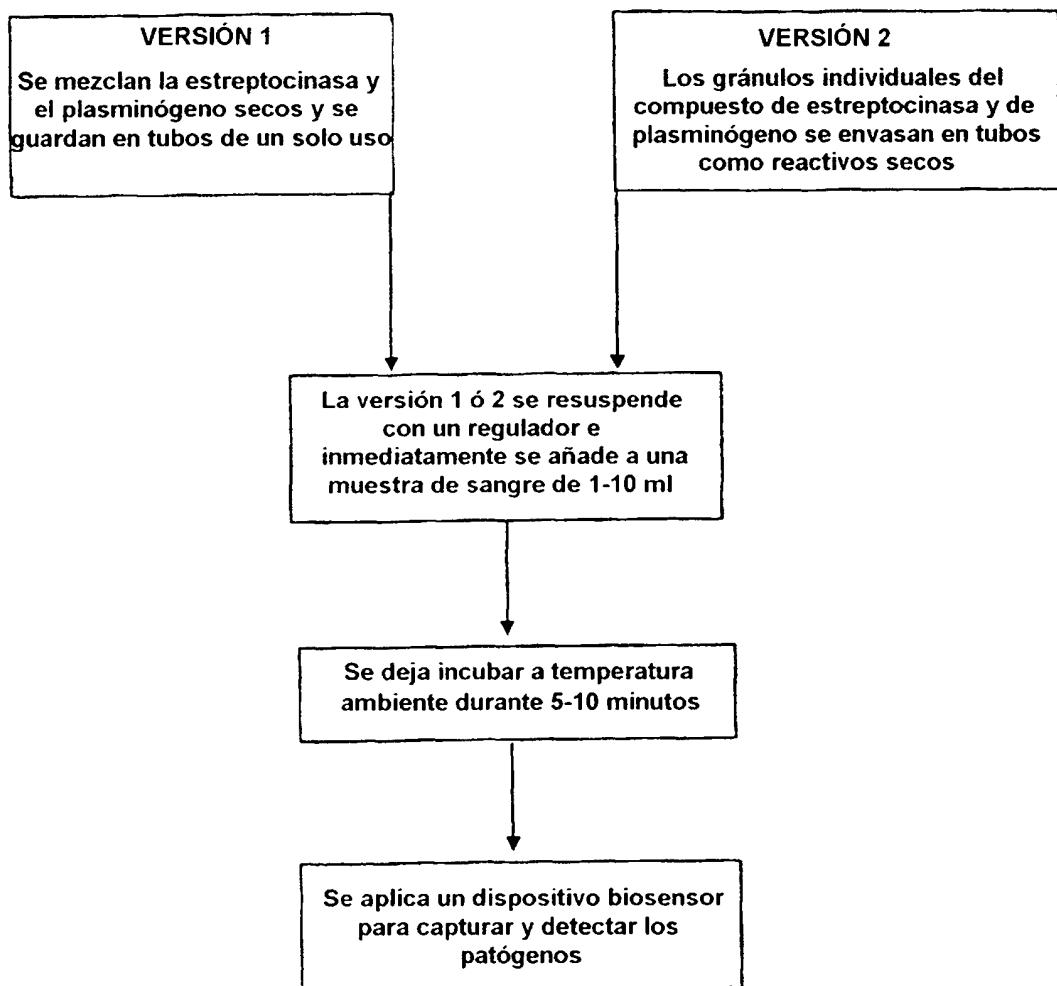


Fig. 16b

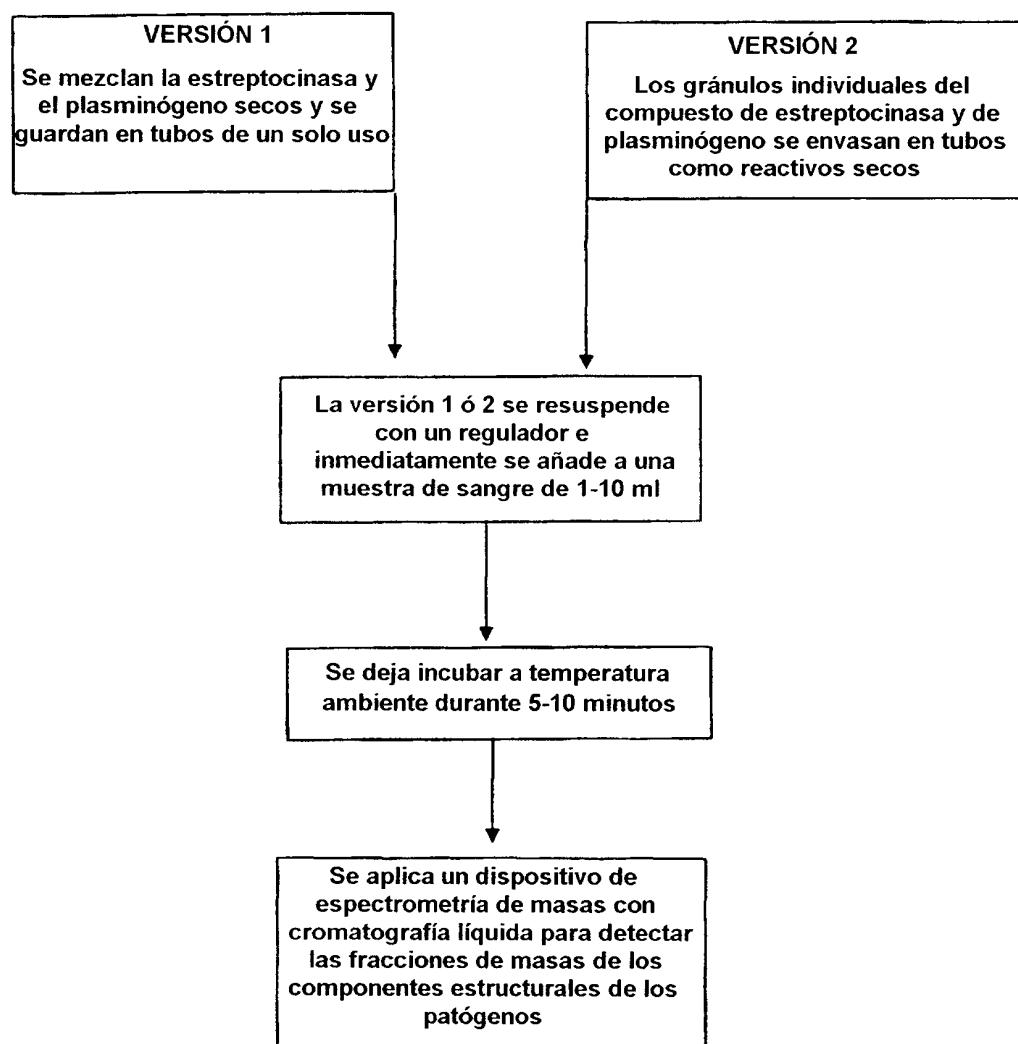


Fig. 17

Puntos de cruce de banda de ruido para muestras de sangre sembradas con *B. anthracis* y procesadas con plasminógeno, estreptocinasa, fosfolipasa A2, ADNasa I y lipasa con centrifugación o filtración

Cantidad de B. anthracis sembrada (cfu)	<u>Centrifugación</u>			<u>Filtración</u>			
	Puntos de cruce de la banda de ruido	Media	Desviación estándar	Puntos de cruce de la banda de ruido	Media	Desviación estándar	
≤ 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
≤ 5,0	38,11	40,36	39,24	36,45	36,09	36,81	36,45
≤ 50,0	37,53	36,24	37,90	37,22	0,87	34,98	0,82
≤ 50,0	36,45	38,15	38,49	37,70	1,09	34,68	0,53
				35,24	34,18	34,70	

Fig. 18

**Sedimentación y solubilización de agregados
de tejido a partir de muestras de sangre de 6 ml
expuestas a diversos tratamientos de
detergentes y enzimas**

Tratamientos de enzima en un regulador de PBS/Tritón X-100						
Triton X-100 en 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
% Observable de agregado de tejido granulado después de la centrifugación	100	100	100	90	10	10
Tiempo (min) para la solubilización de agregado de tejido visible en BLB ^d	> 360	> 60	> 60	> 60	< 10	< 0.5

^a ADNasa I del kit III de aislamiento de ADN MagNa Pure LC de Roche

^b Fosfolipasa A₂

^c Plasminógeno y estreptocinasa 10K U

^d Regulador de lisis bacteriana del kit III de aislamiento de ADN MagNa Pure LC de Roche

Fig. 19

Características de filtración de muestras de sangre de 6 ml expuestas a diversos tratamientos de enzimas y detergentes

Tratamientos de enzima en un regulador de PBS/Tritón X-100						
Triton X-100 en 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
No filtrable	+	+	+			
Filtrable con agregados de tejido observables			+		+	
Filtrable sin agregados observables				+		+

a ADNasa I del kit III de aislamiento de ADN MagNa Pure LC de Roche

b Fosfolipasa A²

c Plasminógeno convertido a plasmina con estreptocinasa 10K U