

(11) Número de Publicação: **PT 1654387 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12Q 1/68** (2007.10)

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

---

(22) Data de pedido: **2004.08.16**

(30) Prioridade(s): **2003.08.15 US 604779**  
**2004.01.14 US 481892 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.05.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.05.06**  
**138/2009**

(73) Titular(es):

**UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA**  
**3802 SPECTRUM BLVD. SUITE 100 TAMPA FL**  
**33612-9220** **US**

(72) Inventor(es):

**MATT EWERT** **US**  
**PHIL AMUSO** **US**  
**ANDREW CANNONS** **US**

(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:

DESCRIÇÃO

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

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se à remoção de ácido aurintricarboxílico (ATA) de uma amostra.

**ANTERIORIDADE DA INVENÇÃO**

O ATA é um anião polimérico que tem sido demonstrado na literatura como sendo um potencial inibidor de ribonuclease. O composto foi descrito anteriormente 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. Por exemplo, o método de extracção de ácido nucleico da arte anterior utiliza sais caotrópicos tais como o tiocianato de guanidina na presença de matrizes de captura tais como sílica ou métodos de precipitação para concentrar os ácidos nucleicos a partir de amostras em bruto.

O uso de ATA num tampão de lise de uma proteinase K é potencialmente superior a 1) sais caotrópicos (uma vez que estes tendem a reduzir a eficiência da hidrolise 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.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

De acordo com a presente invenção, um método para a extracção de ácido nucleico de uma amostra compreendendo ácido aurintricarboxílico (ATA) e um sal caotrópico, compreende a adição de uma composição compreendendo ureia e dietilenotriaminopenta-acetato (DTPA) à amostra antes do isolamento do ácido nucleico, pelo que o ácido nucleico é libertado de ATA.

As características preferidas da invenção são dadas nas reivindicações 2 a 15.

A invenção também se refere a materiais e métodos para o aquecimento de uma solução de ureia, DTPA, opcionalmente contendo EDTA, citrato de sódio e cloreto de sódio, a pelo menos 600°C durante 4 horas, seguido por secagem e combinação com proteinase K e opcionalmente metil-6-O-(N-heptilcarbamoi)- $\alpha$ -D-glucopiranósido, e ao uso deste reagente para permitir a remoção de ATA de extractos de ácidos nucleicos preparados com métodos existentes da arte anterior baseados em sais caotrópicos, seguido por centrifugação ou métodos descritos neste documento, de forma a permitir a hibridação a jusante de espécies de ARN directamente a partir de amostras de sangue total tratado.

A invenção também se refere ao reagente de ureia/DTPA que sofre um tratamento térmico acima de 600°C durante 4 horas durante a produção e é usado no tratamento de amostras como acima descrito, seguido pela combinação de urease para quebrar a ureia seguida por análise de *RNA array*.

O ácido aurintricarboxílico (ATA) é um anião polimérico que tem sido demonstrado na literatura como sendo um potencial inibidor de ribonuclease. O composto foi descrito anteriormente como um aditivo para tampões de lise de amostras onde o objectivo é extrair espécies de ARN de amostras de tecidos. Mostrou-se que o extracto de ácido nucleico derivado de tais procedimentos é adequado para análises de hibridação e 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 a partir de composições contendo ácido nucleico têm girado em torno de procedimentos cromatográficos que eliminam ou retiram somente uma porção do ATA.

A utilização de ATA num tampão de lise de proteinase K é potencialmente superior a 1) sais caotrópicos (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 quebrados pela proteinase K); e 3) EDTA (o qual apenas inibe nucleases indirectamente através da 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).

Também não foi anteriormente descrita na arte uma maneira de utilizar ATA num tampão de lise para tratar uma amostra de sangue total de grande volume (1-10ml) e após vários passos de adição de reagentes passam directamente à hibridação por RNA array usando toda a amostra de sangue para um evento de análise, contornando por isso a extracção e amplificação do ARN.

Também não foi anteriormente descrita na arte uma maneira de usar amostras de sangue tratadas com ATA contendo misturas em combinação com a captura de patogénios utilizando péptidos bioactivos funcionalizados em ácido hialurónico detalhadas no pedido U.S. número 10/604,779 onde o ácido hialurónico, por sua vez, actua como um guia de onda polimérico.

Também não foi anteriormente descrita na arte uma maneira de causar uma libertação de cálcio no local de captura do patogénio através de um péptido bioactivo ou da hibridação de espécies de ARN, de modo a desencadear a conversão do

fibrinogénio marcado por uma molécula repórter em fibrina insolúvel no local de captura do patogénio através de um péptido bioactivo ou da hibridação de espécies de ARN sobre a matriz do guia de onda polimérico ácido hialurónico.

O ATA serve também uma função importante na protecção do ADN bacteriano, quando essa bactéria está presente numa amostra de sangue processada com reagentes contendo níveis elevados ( $\geq 100$  U/ml) de ADNase I, como é usado em várias concretizações contidas no pedido U.S. número 10/604,779. Com o objectivo de atingir capacidades de detecção de ARN que são superiores ao que pode ser atingido com a tecnologia descrita no pedido U.S. número 10/604,779 e para o fazer sem passos ou exigências adicionais, a presente invenção é utilizada em combinação com a tecnologia de tratamento de amostras de sangue descrita no pedido U.S. número 10/604,779 e os métodos de extracção de ácidos nucleicos da arte anterior que utilizam sais caotrópicos tais como tiocianato de guanidina na presença de matrizes de captura tais como a sílica ou os métodos que utilizam métodos de precipitação para concentrar ácidos nucleicos a partir de amostras em bruto.

Em conformidade, permanece uma necessidade na arte para: 1) um método de destruir e tornar solúvel o espectro de componentes dos elementos sanguíneos (eritrócitos, leucócitos, membranas nucleares, fibrina e ácido nucleico hospedeiro) sem danificar partículas de analito (bactérias, vírus, fungos, toxinas, marcadores metabólicos, marcadores de estado de doença ou agentes químicos), a fim de expor e concentrar rapidamente (por centrifugação, filtração ou captura) as partículas de analito de grandes volumes de sangue, 2) remoção do ADN hospedeiro e da biomassa associada à matriz presente na amostra de sangue de grande volume usando um cocktail de detergente enzimático de passo único que é susceptível de automação e sistemas portáteis e 3) um método de concentração de partículas de analito que pode ser acoplado a processos manuais ou automatizados já existentes para a extracção de ácidos nucleicos, testes de biosensor, ou separação por cromatografia líquida e análise por espectrometria de massa.

**BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a métodos e materiais para a extracção de patogénios infecciosos de um volume de uma amostra, tal como sangue e incluem os passos de criação de um agregado de fibrina que confina os patogénios e de 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 enzimaticamente com o plasminogénio para formar plasmina após a descongelação e a introdução na amostra de fibrina. Preferivelmente, o plasminogénio é suspenso antes da congelação numa solução salina aquosa, incluindo NaCl e Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. O reagente de lise de fibrina é preferivelmente composto por ADNase e Fosfolipase A<sub>2</sub>. A enzima ADNase é usada para facilitar a ruptura física e química de elementos sanguíneos sedimentados que resultam do protocolo anteriormente descrito. A Fosfolipase A<sub>2</sub> é usada para ajudar a digestão de ADN humano por destruição das bicamadas fosfolipídicas e, consequentemente, pela destruição da membrana nuclear.

A presente invenção refere-se a materiais e métodos para a remoção eficiente de ATA de uma amostra tal como uma amostra consistindo numa composição de ácido nucleico. Os presentes métodos proporcionam uma composição de ácido nucleico suficientemente isenta de ATA de modo a que possam ser realizadas uma reacção de RT-PCR e outras reacções envolvendo transcriptase inversa.

A presente invenção refere-se também a materiais e métodos para uma mistura de ATA, cloreto de magnésio, fosfato de potássio e cloreto de sódio que é seca e combinada com outros componentes secos como os descritos neste documento.

A presente invenção refere-se também a materiais e métodos para o aquecimento de uma solução de ureia, dietilenotriaminopenta-acetato DTPA, opcionalmente contendo EDTA, citrato de sódio e cloreto de sódio, até pelo menos 600°C durante 4 horas, seguido por secagem e combinação com

proteinase K e opcionalmente metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)- $\alpha$ -D-glicopiranósido, e a utilização deste reagente para permitir a remoção de ATA de extractos de ácidos nucleicos feitos com métodos existentes da arte anterior baseados em sais caotrópicos ou precipitação de ácido nucleico, seguido por centrifugação ou métodos descritos neste documento, de forma a permitir a hibridação a jusante de espécies de ARN directamente a partir de amostras de sangue total tratado.

A presente invenção refere-se também ao reagente de ureia/DTPA que sofreu um tratamento térmico acima de 600°C durante 4 horas durante a produção e foi usado no tratamento da amostra como acima descrito, seguido pela combinação de urease para quebrar a ureia seguido por análise de *RNA array*.

A presente invenção refere-se também a materiais e métodos para captura de patogénios usando péptidos bioactivos funcionalizados em ácido hialurónico, como descrito neste documento, onde o ácido hialurónico, por sua vez, actua como um guia de onda polimérico.

A presente invenção refere-se também a métodos para provocar uma libertação de cálcio no local de captura dos patogénios através de um péptido bioactivo ou da hibridação de espécies de ARN, de modo a desencadear a conversão do fibrinogénio marcado por uma molécula repórter em fibrina insolúvel no local de captura de patogénios através de um péptido bioactivo ou da hibridação de espécies de ARN sobre a matriz do guia de onda polimérico ácido hialurónico.

A presente invenção refere-se também a materiais e métodos em que a matriz de ácido hialurónico, que é reticulada usando biotina e estreptavidina e é funcionalizada com péptidos bioactivos, tais como os descritos neste documento, pode ser posteriormente quebrada com hialuronidase, a fim de facilitar a eluição dos patogénios.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 é uma vista em diagrama de um método para análise de patogénios.

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

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 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.

As Figuras 8-9 são vistas em diagrama da recuperação bacteriana e da lise de fibrina, de acordo com o Protocolo 1.

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

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

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

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

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

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

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 A<sub>2</sub>, 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.

#### **DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção será descrita no contexto da 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 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. O reagente de lise de fibrina é preferivelmente composto por ADNase e Fosfolipase A<sub>2</sub>. A enzima ADNase é usada para facilitar a ruptura física e química dos elementos sanguíneos sedimentados que resultam do protocolo anteriormente descrito. A Fosfolipase A<sub>2</sub> é utilizada para ajudar a digestão de ADN humano por destruição das bicamadas fosfolipídicas e, consequentemente, pela destruição da membrana nuclear.

A presente invenção 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 A<sub>2</sub> e solubilidade do Magnésio óptimas. O magnésio está presente na solução tampão na forma do catião bivalente que acciona a actividade da Fosfolipase A<sub>2</sub>, na presença de ADNase. A arte anterior utiliza cálcio na forma do catião bivalente clássico para accionar a actividade da Fosfolipase A<sub>2</sub>, no entanto, o cálcio não é compatível com os iões fosfato essenciais para a solubilização dos elementos sanguíneos.

Uma concretização da presente invenção 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, NaPO<sub>4</sub> 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 A<sub>2</sub>, 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 biosensor 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 biosensor. 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-heptilcarbamool)- $\alpha$ -D-glucopiranósido 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-heptilcarbamool)- $\alpha$ -D-glucopiranósido. O tampão de armazenagem de trealose compreende tampão fosfato de potássio 10 mM, Triton X-100 a 0,01-0,04%, Ditiotreitol 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.

Numa concretização alternativa da invenção, seria utilizado um dispositivo 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 A<sub>2</sub>, 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-heptilcarbamoiil)-α-D-glicopiranósido, saponina e PBS / magnésio mais enzimas seleccionadas a partir do grupo de estreptoquinase, plasminogénio, fosfolipase A<sub>2</sub>, 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 invenção gera ADN analito 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 extração

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 A<sub>2</sub>, 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 A<sub>2</sub>, 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 da invenção 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 Aurintriangularico cerca de 10-200 mM e Triton X-100 a cerca de 1,0-1,2%. O Ácido Aurintriangularico é evidenciado para proporcionar um nível de protecção ao ácido nucleico bacteriano sem impedir a digestão do ADN humano. O uso de Ácido Aurintriangularico não é descrito nos métodos anteriores de digestão de ADN humano. O metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)-α-D-glucopiranósido e a saponina podem ser substituídos por Triton X-100. Numa concretização, o metil-6-O-(N-heptilcarbamoíl)-α-D-glucopiranósido 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-glucopiranósido é armazenado com a Fosfolipase A<sub>2</sub>, 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-glucopiranósido e solução de saponina permite a actividade eficiente da Fosfolipase A<sub>2</sub>, 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-

glucopiranósido 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)- $\alpha$ -D-glucopiranósido, 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 extração 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 A<sub>2</sub> e Lipase. Alternativamente, também podem ser usadas combinações de enzimas compreendendo Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease e Fosfolipase A<sub>2</sub>. Noutra combinação alternativa podem ser usadas Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease assim como ADNase ou Endonuclease, Fosfolipase A<sub>2</sub> e Lipase. A ADNase ou a Endonuclease em combinação com a Fosfolipase A<sub>2</sub> 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 A<sub>2</sub> e Lipase. Alternativamente, também podem ser usadas combinações de enzimas compreendendo Estreptoquinase, Plasminogénio, ADNase ou Endonuclease e Fosfolipase A<sub>2</sub>. 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 Aurintriangularboxílico 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 Aurintriangularboxílico 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 Aurintriangularboxílico 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 isoftiocianato 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 biosensor que irá capturar e detectar as bactérias, vírus, fungos, toxinas, priões, 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 outro 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 priões 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.

A presente invenção refere-se a materiais e 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 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 subsequentemente adicionado um líquido ou um fluido. Numa concretização exemplificada, é usada uma composição da invenção 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, opcionalmente, 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-heptilcarbamol)- $\alpha$ -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-heptilcarbamoil)- $\alpha$ -D-glucopiranósido 10 - 20 mg / ml
Proteinase K 600 - 1000 $\mu$ 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 aminas 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,抗原s 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 ebulação 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, 2009-07-13

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a extracção de ácido nucleico de uma amostra compreendendo ácido aurintricarboxílico (ATA) e um sal caotrópico, compreendendo a adição de uma composição compreendendo ureia e dietilenotriaminopenta-acetato (DTPA) à amostra antes do isolamento do ácido nucleico, pelo que o ácido nucleico está isento de ATA.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende adicionalmente citrato de sódio.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a composição compreende adicionalmente proteinase K.
4. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente metil-6-O-(N-heptilcarbamool)- $\alpha$ -D-glucopiranósido.
5. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente etilenodiaminetra-acetato.
6. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que o pH da amostra é levado a cerca de 8,0.
7. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição compreende adicionalmente hidróxido de sódio.
8. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a composição é um pó seco.
9. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a concentração de ureia na amostra é de 6,0 a 7,5 M.
10. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a amostra é subsequentemente posta em contacto com urease.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que são adicionadas 1000 a 100 000 unidades da urease por ml de amostra.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, o qual compreende o passo prévio de aquecimento de uma solução compreendendo ureia e DTPA a pelo menos 600°C.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a ureia e o DTPA são aquecidos durante cerca de 4 horas.

14. Método de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, em que a extração de ácido nucleico compreende os passos de lavagem e/ou ligação e a amostra é aquecida entre 55 e 65°C durante os passos de lavagem e/ou ligação.

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

Lisboa, 2009-07-13

RESUMO

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

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 NaCl e Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. 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.

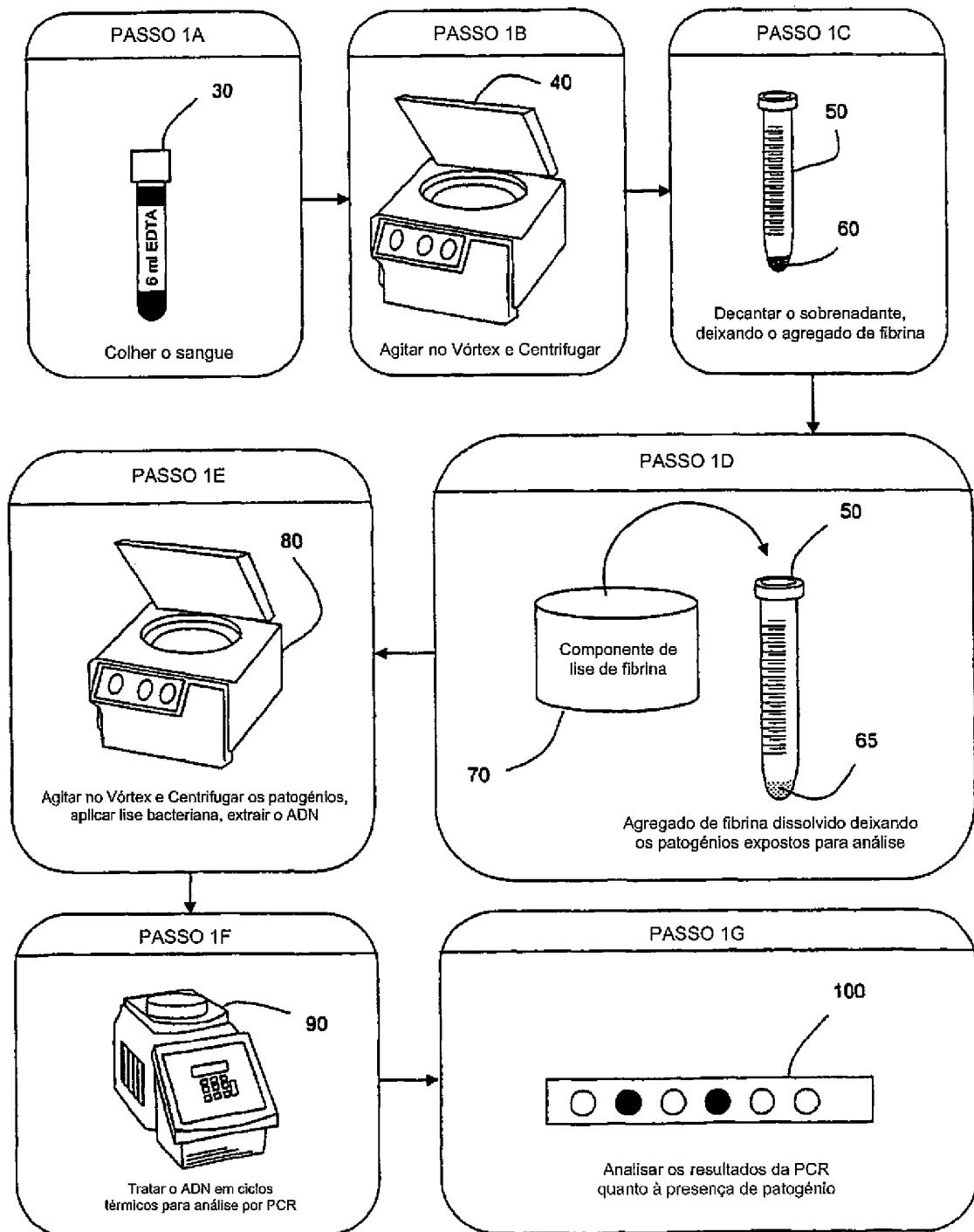
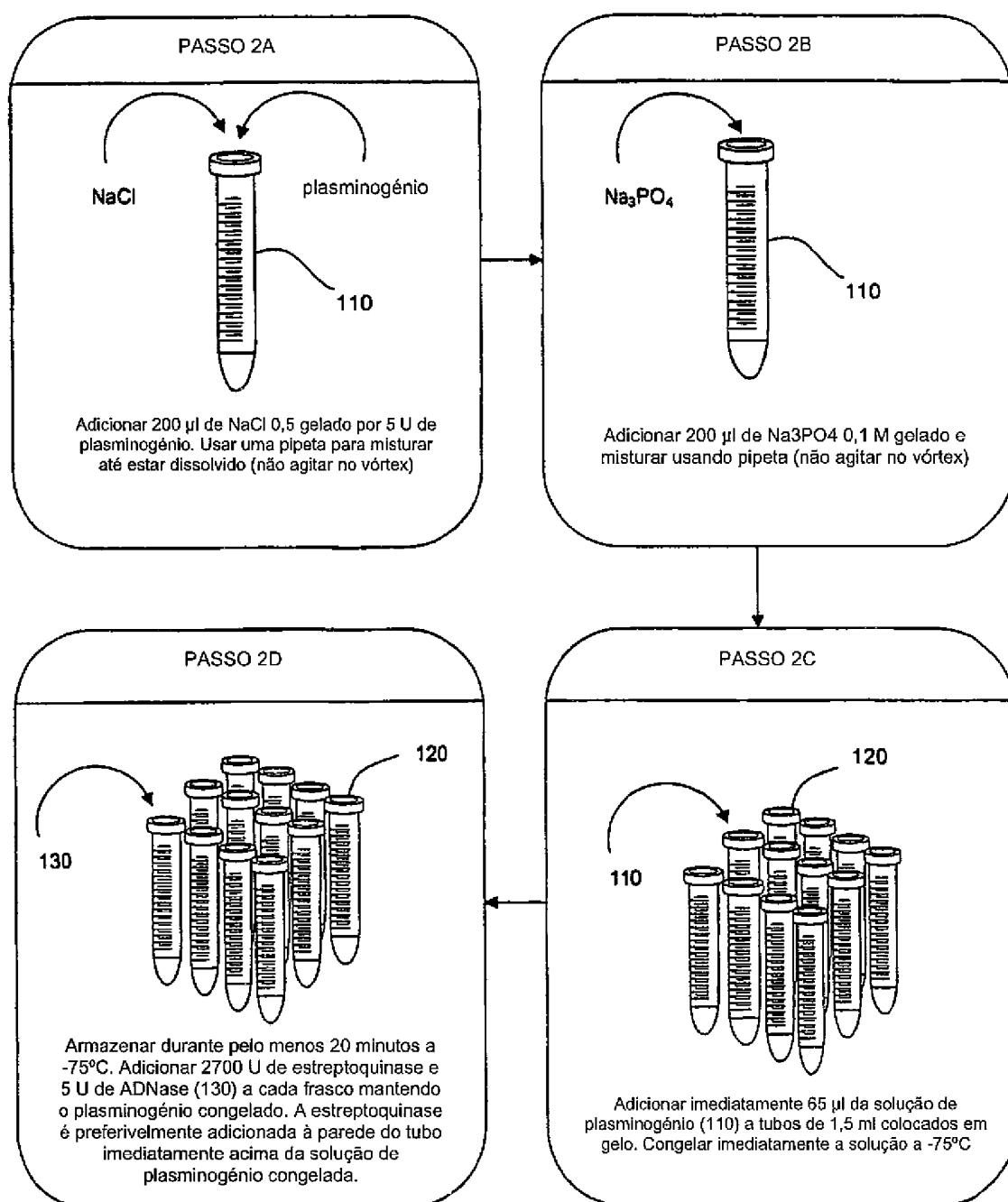
**Fig. 1**

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 genómico/ 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	<b>36.75</b>	<b>37.76</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA2	<b>36.59</b>	<b>37.86</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA3	<b>35.97</b>	<b>38.10</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA4	<b>37.26</b>	<b>39.53</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA5	<b>35.36</b>	<b>40.11</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA6	<b>36.35</b>	<b>45.19</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA7	<b>36.62</b>	<b>38.64</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M3200253BA8	<b>37.04</b>	<b>39.51</b>	<b>13.75</b>	Inoc. positiva
M320020BA9	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	Branco
M/3200226BA1	<b>37.16</b>	<b>39.35</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA2	<b>36.79</b>	<b>40.28</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA3	<b>37.92</b>	<b>39.94</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA4	<b>37.49</b>	<b>40.16</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA5	<b>39.66</b>	<b>40.26</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA6	<b>39.31</b>	<b>41.19</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/3200226BA7	<b>38.48</b>	<b>40.73</b>	<b>1.38</b>	Inoc. positiva
M/320020BA8	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	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 genómico/ 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. 5

## Conjunto de dados do protocolo sanguíneo para *Bacillus anthracis*: Avaliação do protocolo sanguíneo por um funcionário do laboratório do Departamento de Saúde

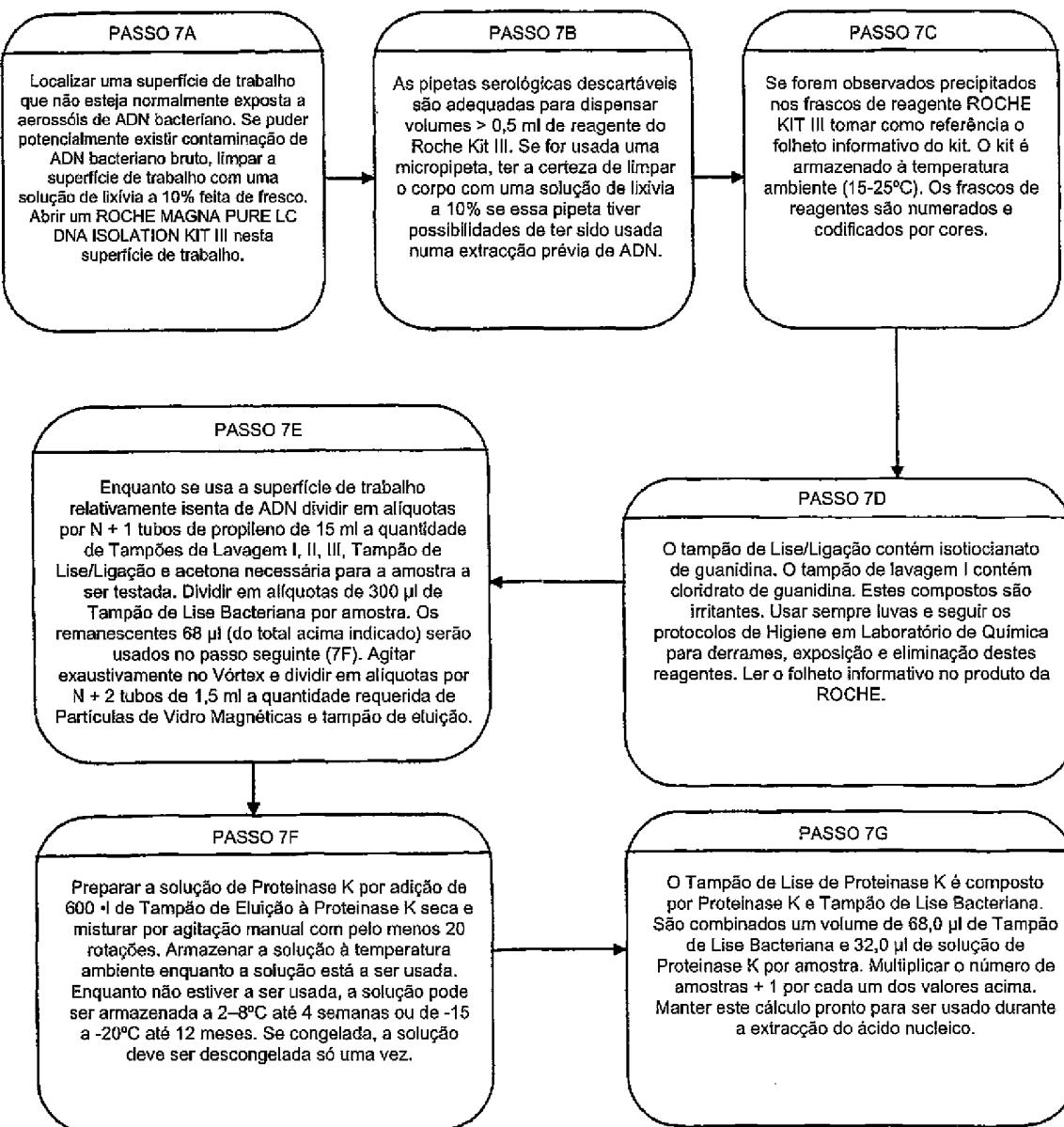
Número da amostra	Iniciador de pXO2/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler	Iniciador genómico/ Sondas – Ponto de cruzamento no LightCycler	Média calculada de UFC / 6 ml de sangue	Comentários ao tipo de amostra: Todas as amostras de sangue do mesmo lote que na Tabela 1
M3200256BA1L	38.81	39.93	13.75	Inoc. positiva
M3200256BA2L	36.10	39.26	13.75	Inoc. positiva
M/3200223BA3L	36.77	38.58	1.38	Inoc. positiva
M320020BA4L	0.00	0.00	0.00	Branco

Fig. 6

## Conjunto de dados do protocolo sanguíneo para *Yersinia pestis*

Fig. 7

## Preparação dos reagentes de extracção



### Recuperação bacteriana e lise de fibrina

**Fig. 8**

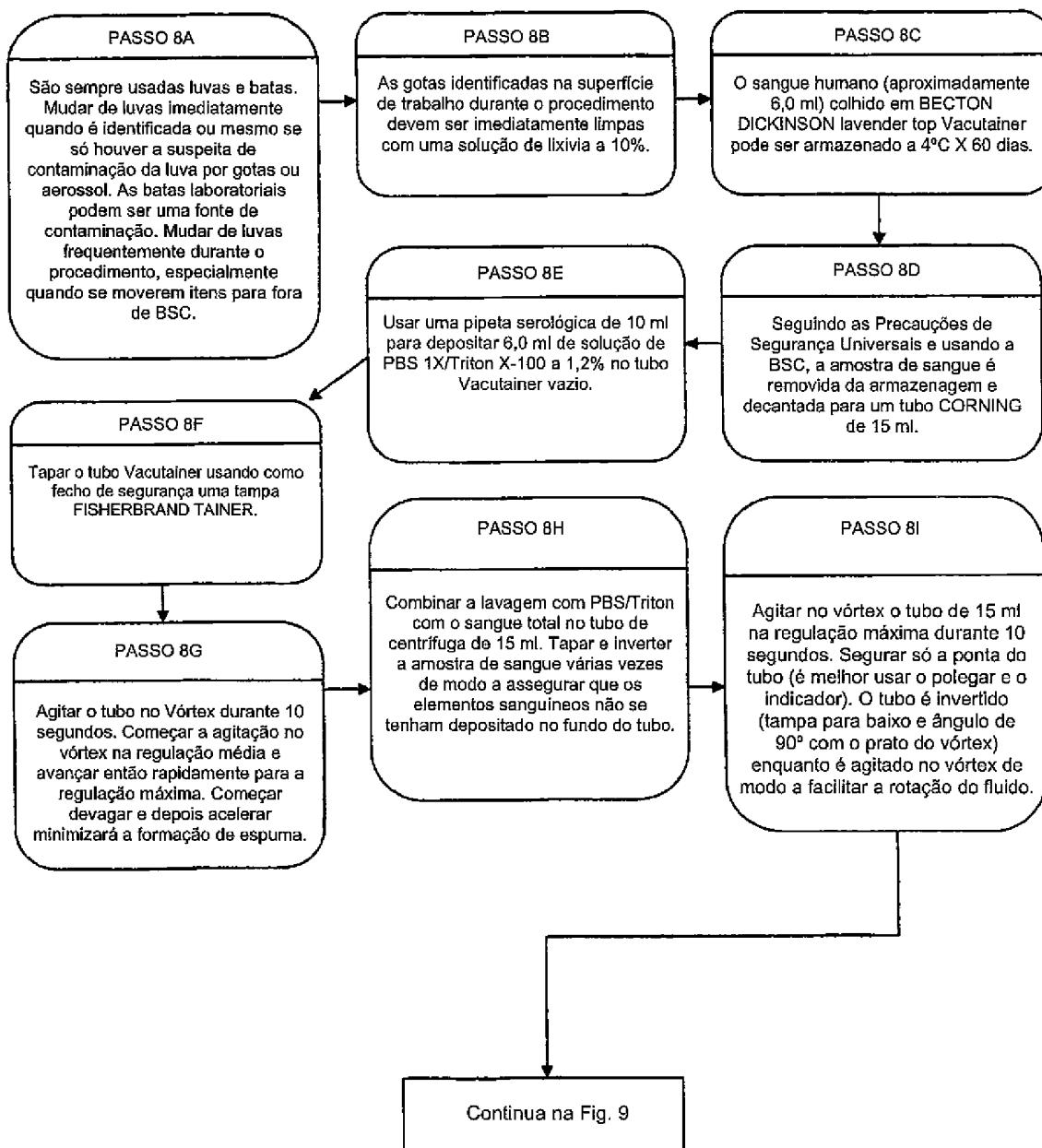


Fig. 9

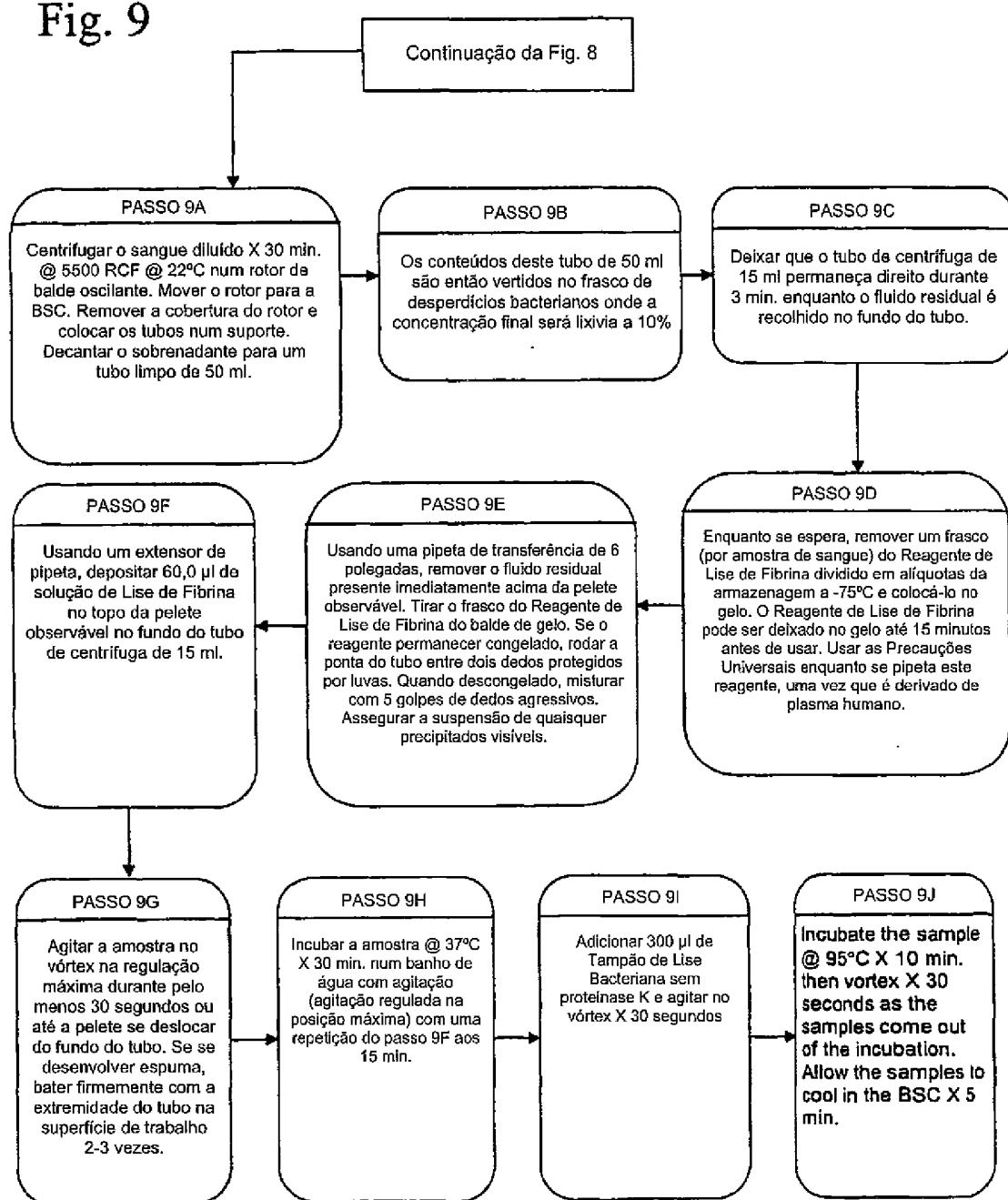


Fig. 10

## Lise Bacteriana e Extracção de Ácido Nucleico

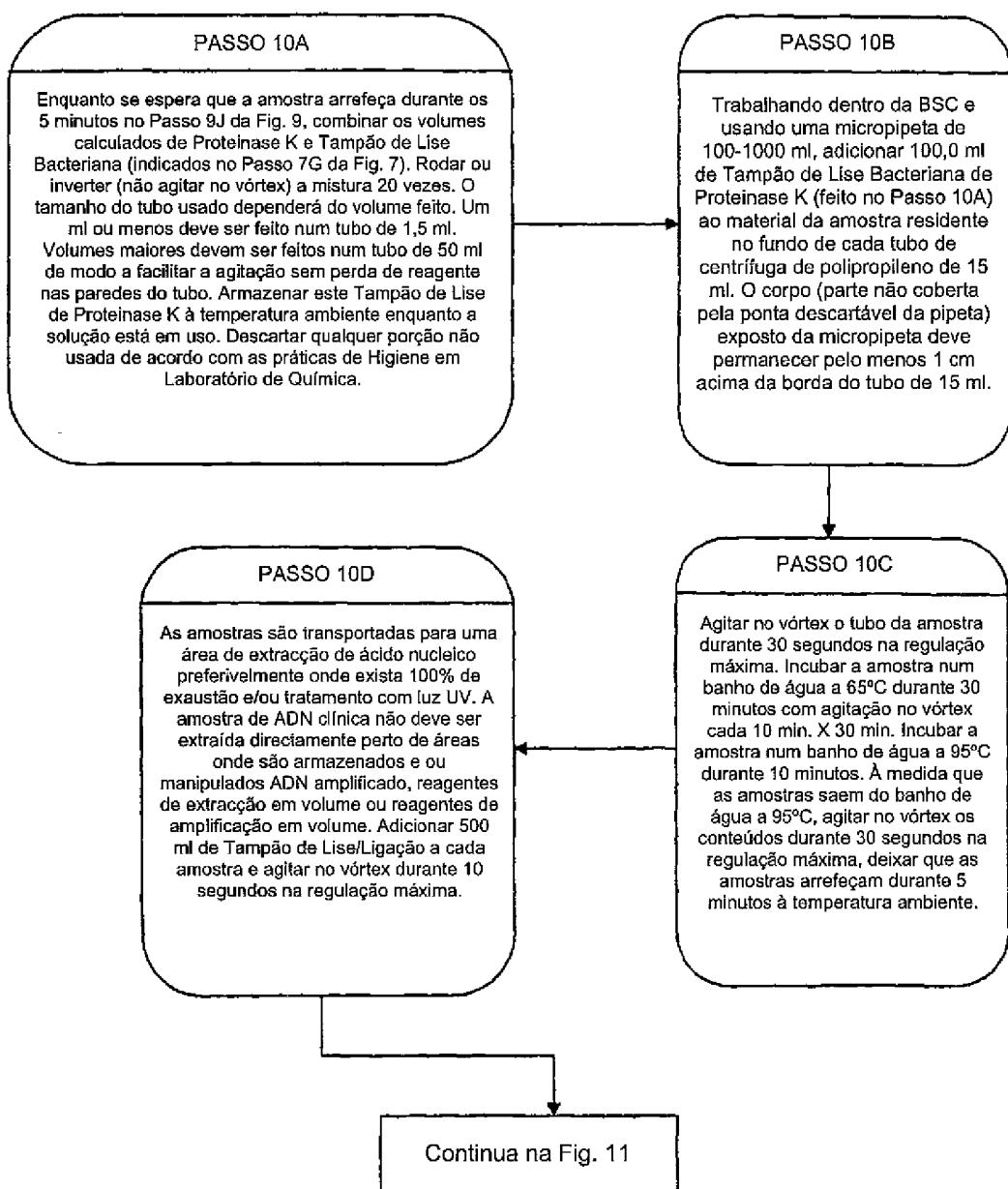


Fig. 11

Continuação da Fig. 10

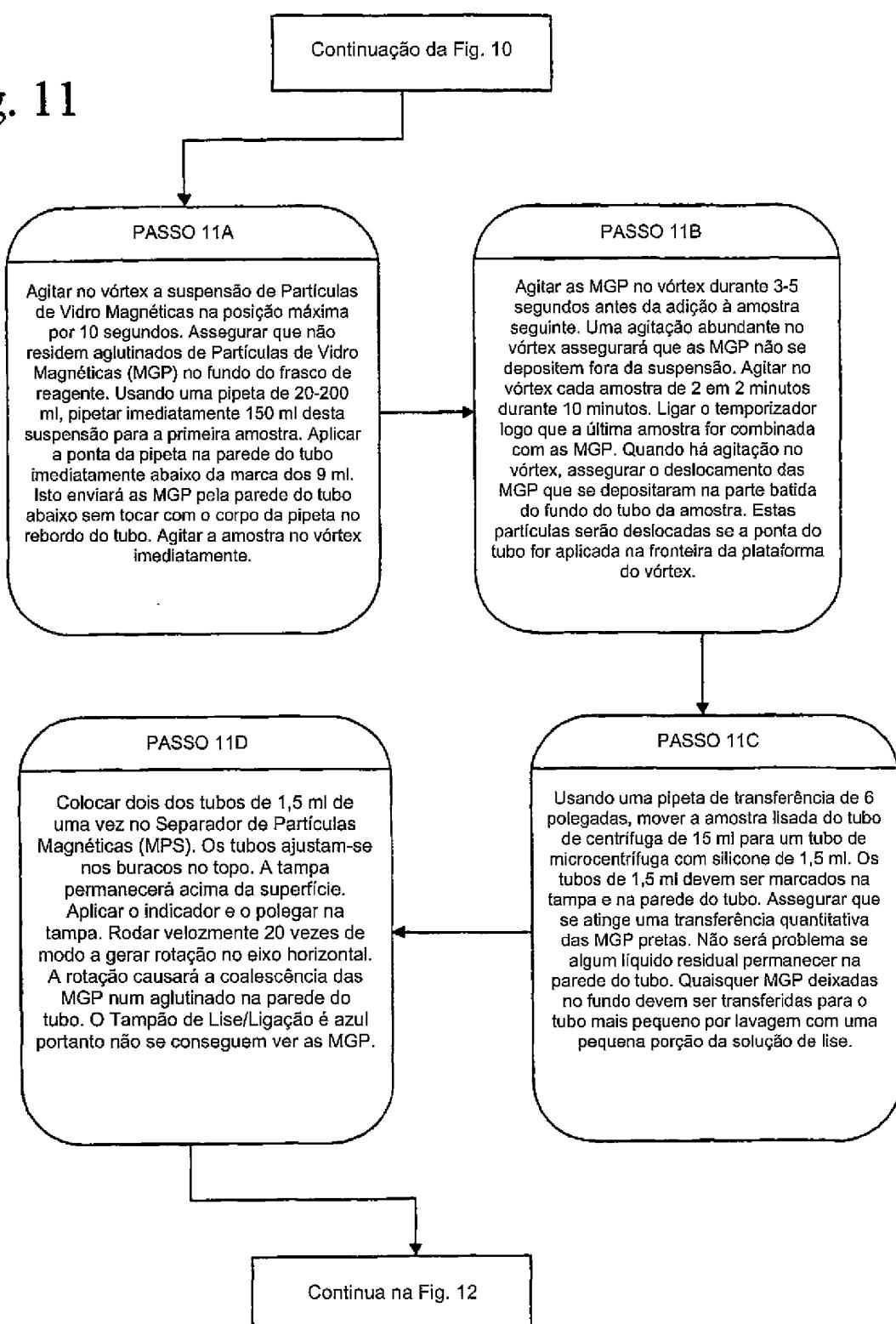


Fig. 12

Continuação da Fig. 11

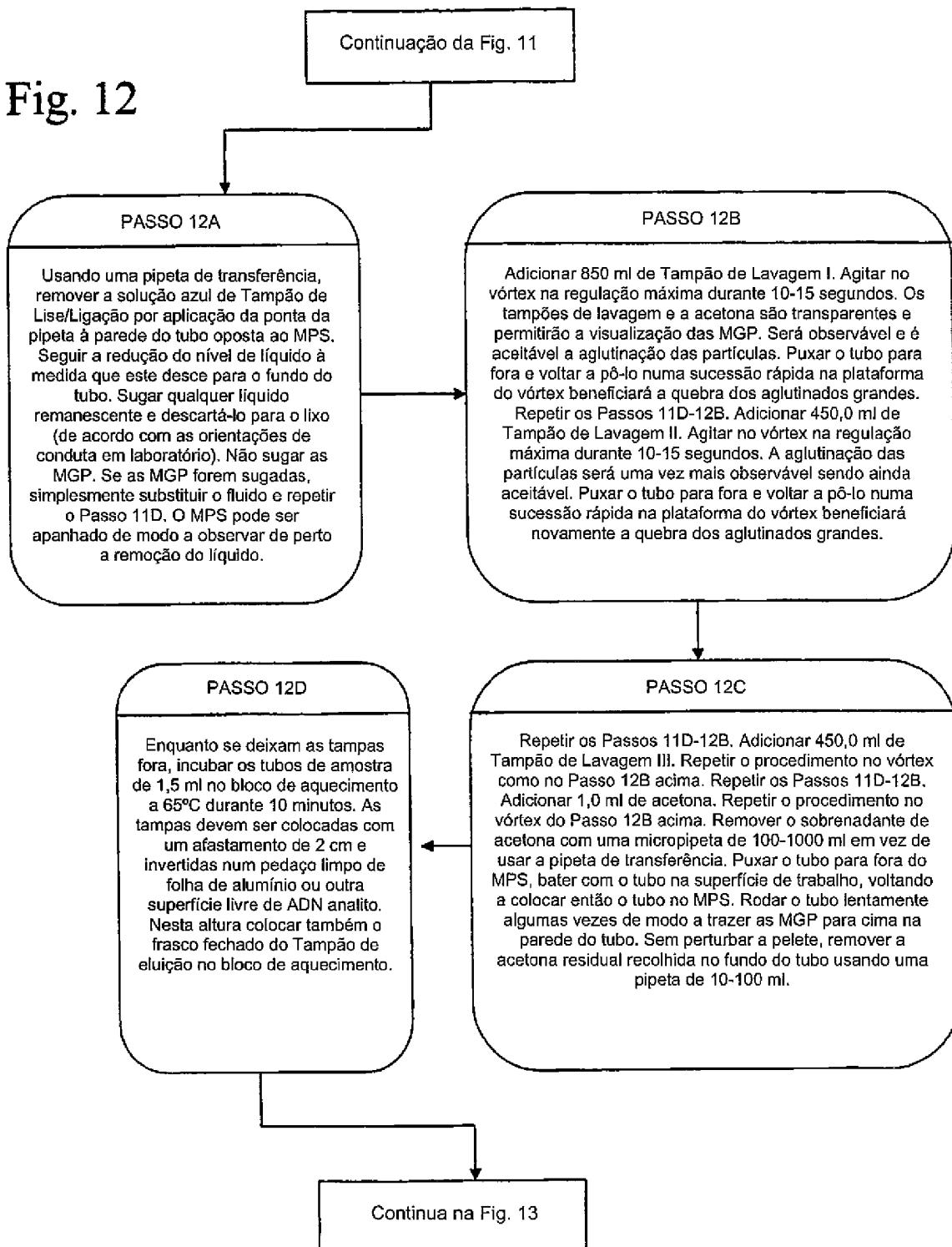


Fig. 13

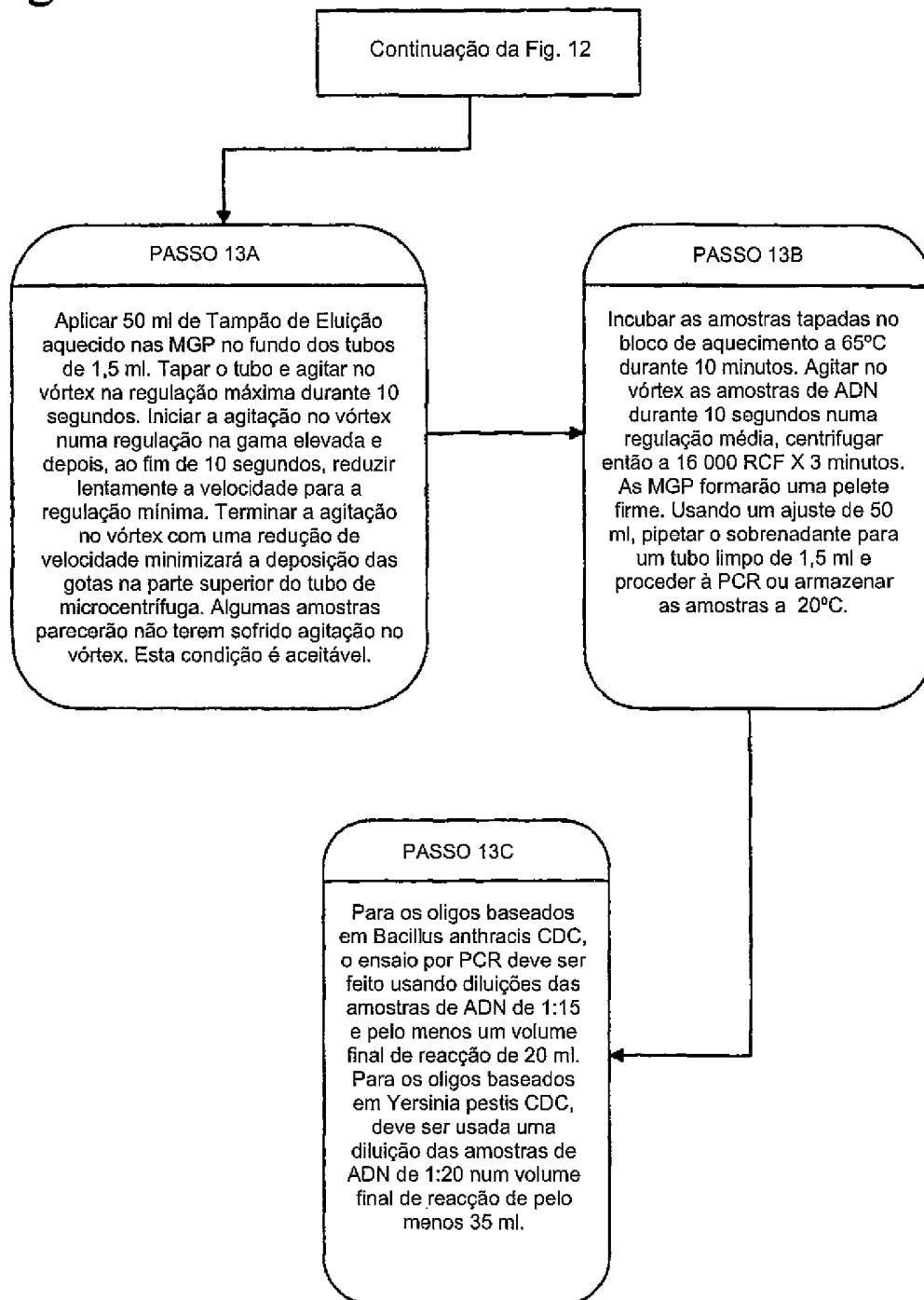


Fig. 14a

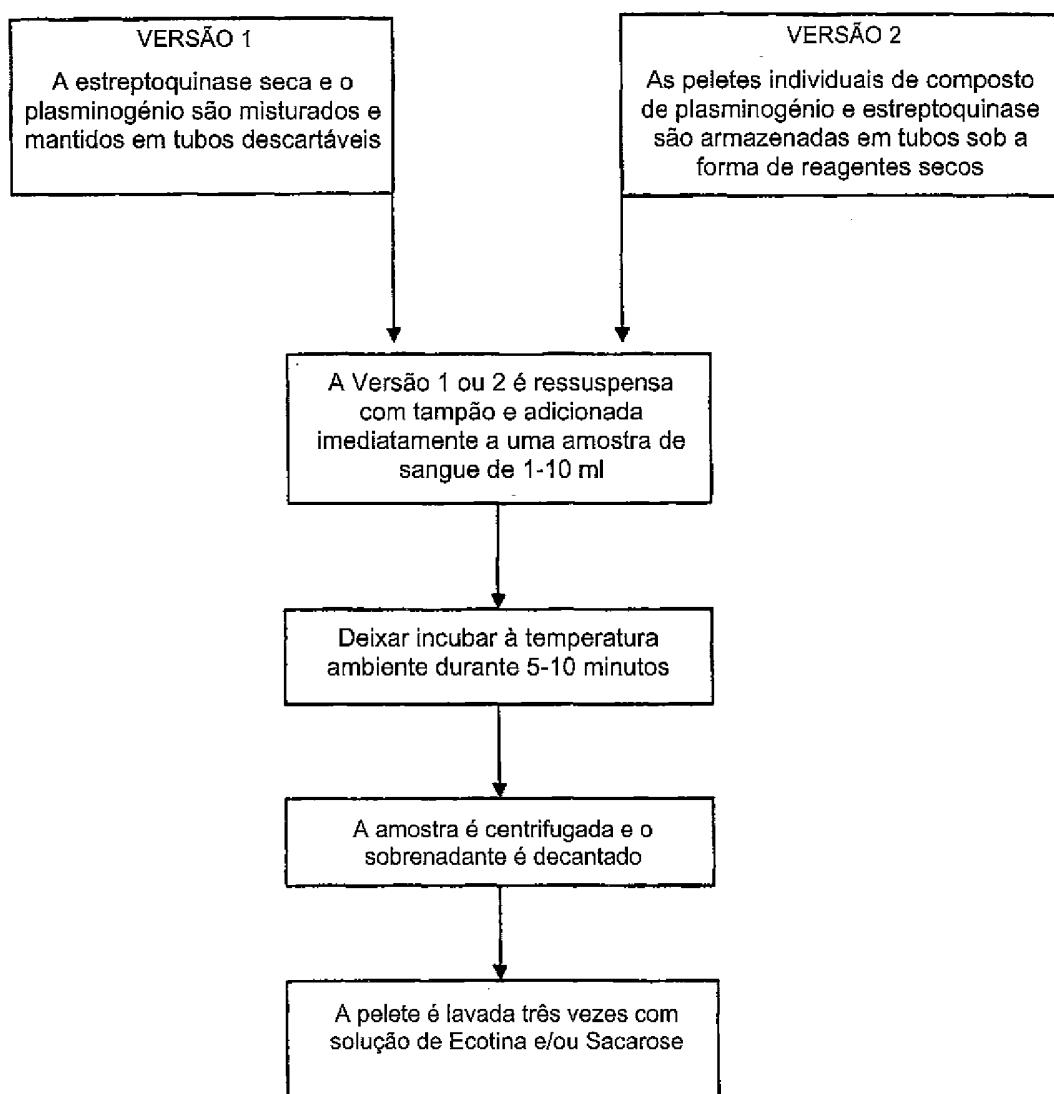
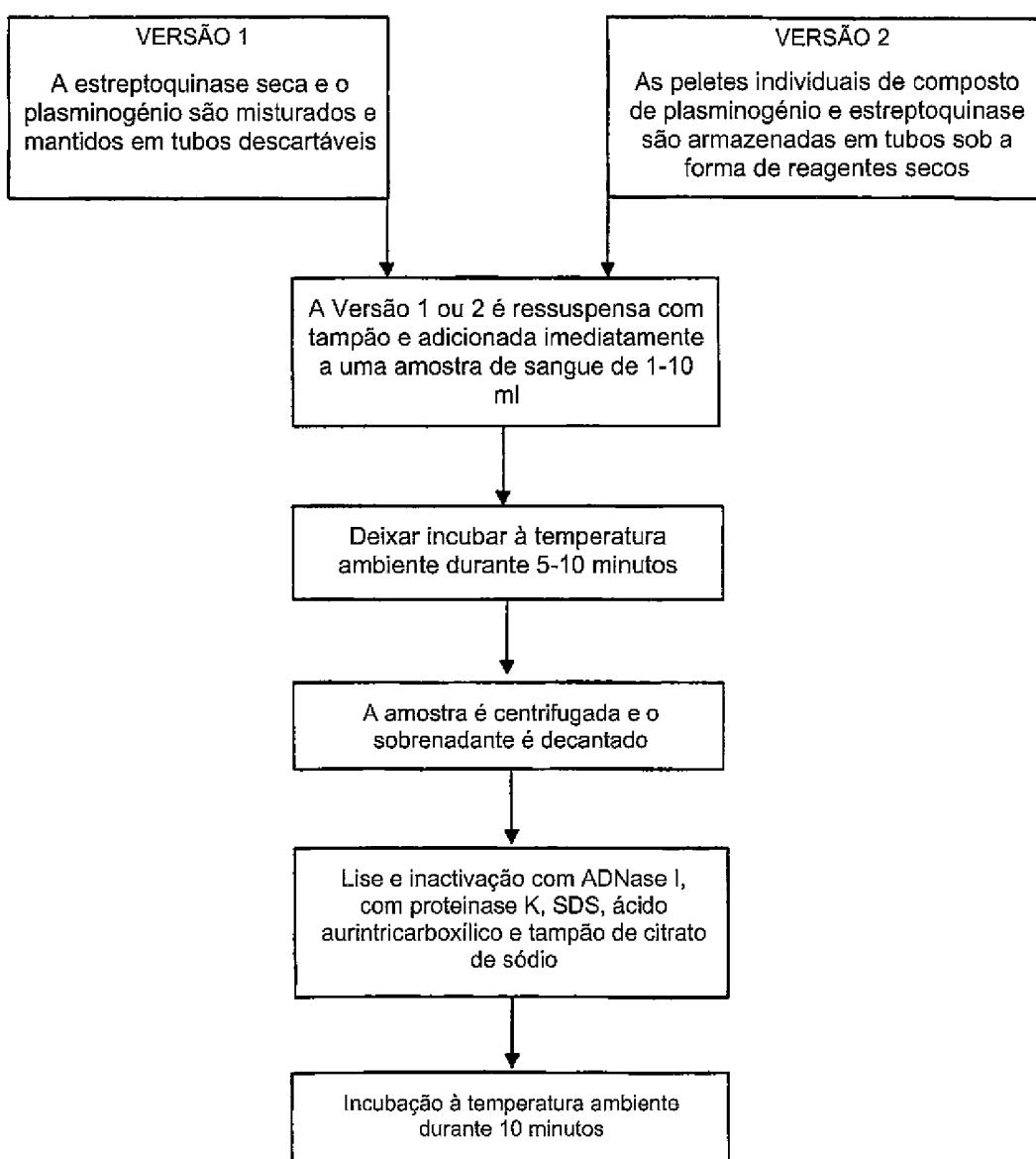


Fig. 14b



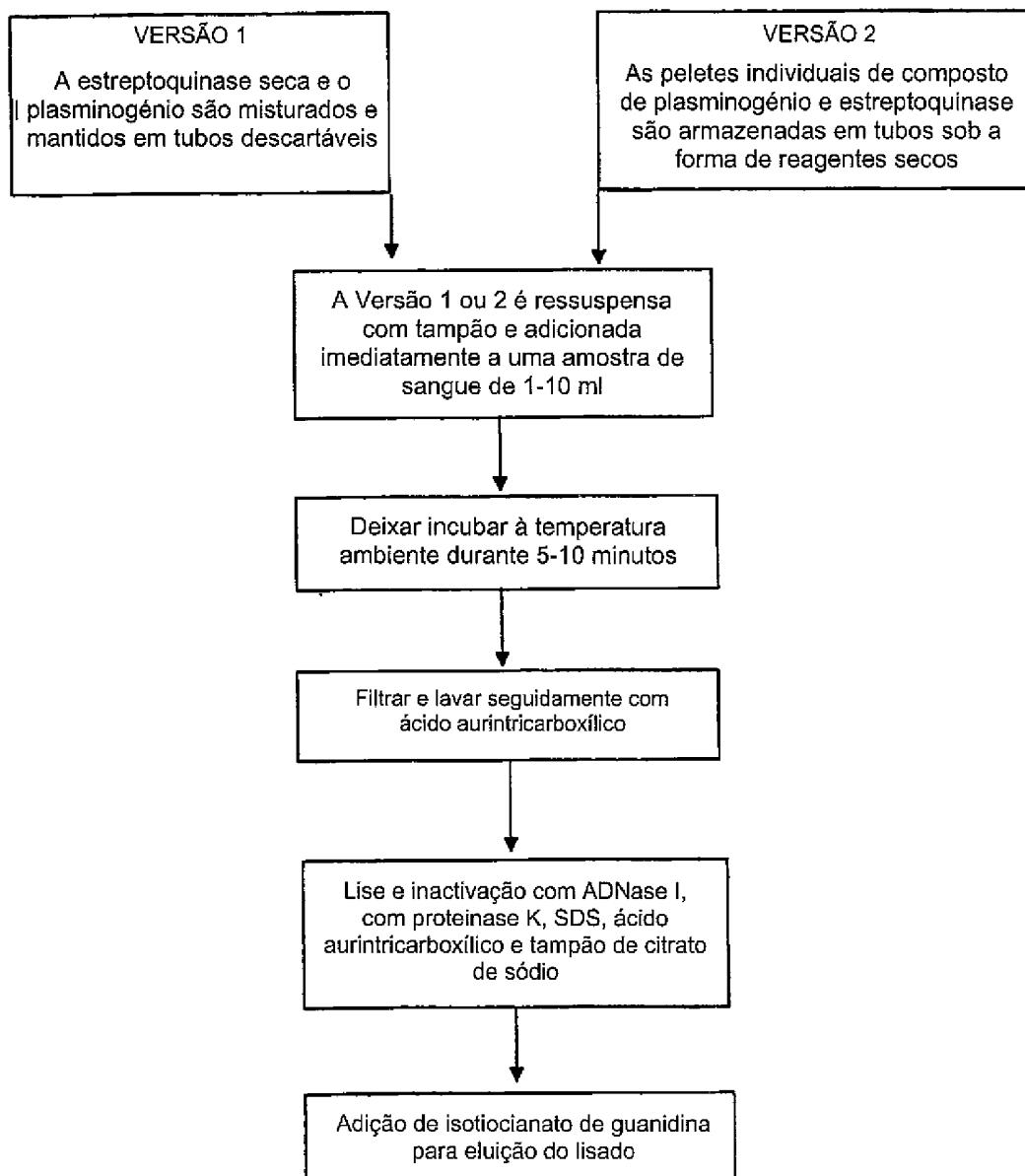
**Fig. 15**

Fig. 16a

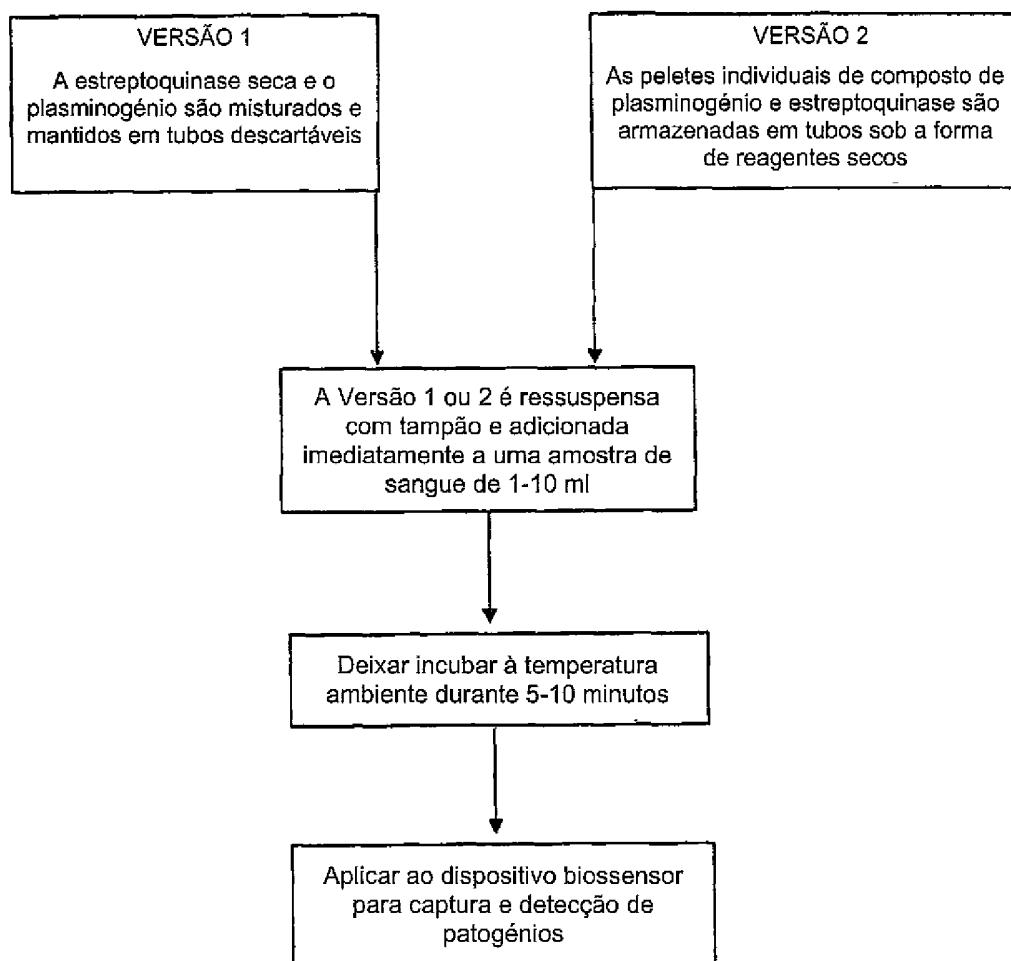
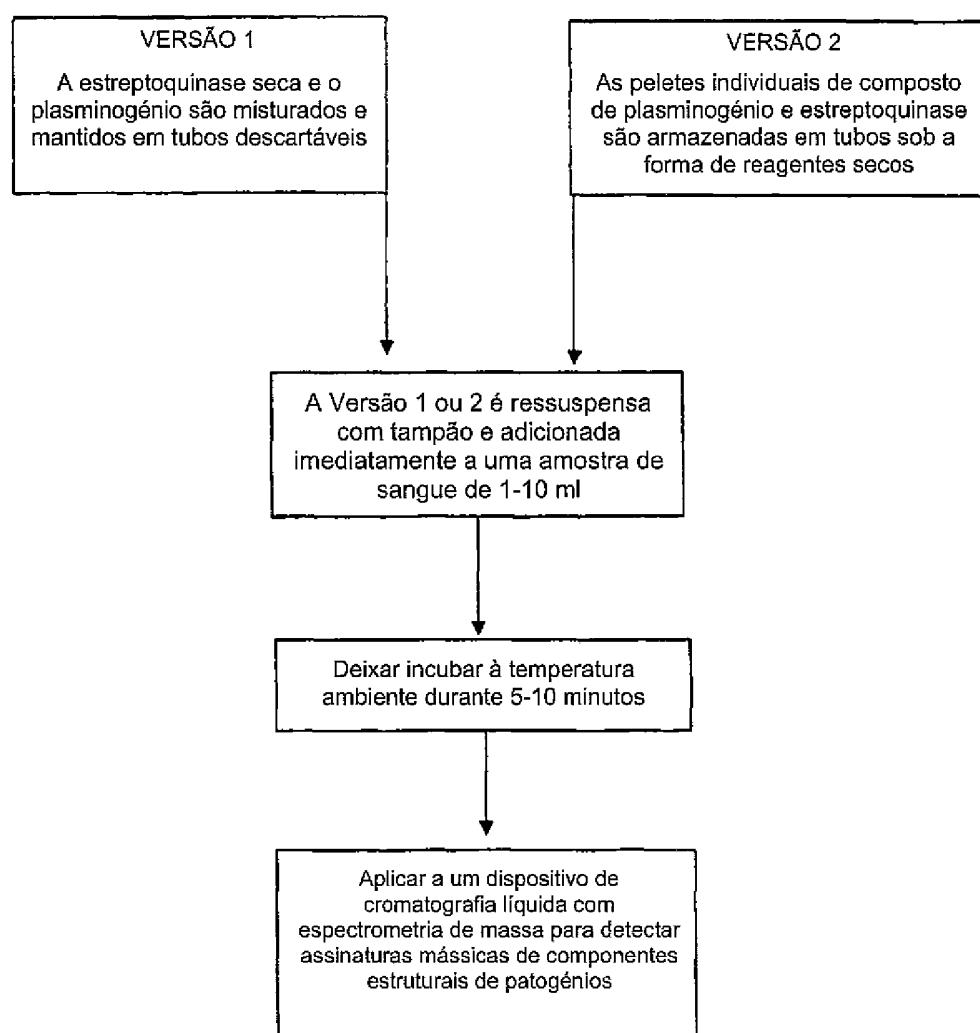


Fig. 16b



**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	Média	Desvio Padrão	Pontos de cruzamento de bandas de ruído	Média	Desvio Padrão
≤ 0.01				40.33	39.89	
≤ 0.01				37.79	37.79	
≤ 1.0				40.36	37.69	39.03
≤ 1.0	41.93	40.31	41.12	37.90	37.70	37.79
≤ 2.0		40.47	40.47	36.45	36.09	36.81
≤ 2.0	38.11	40.36	39.24	35.75	34.12	34.98
≤ 5.0	37.53	36.24	37.90	35.75	34.12	34.98
≤ 5.0	36.45	38.15	38.49	35.24	34.18	34.68
≤ 50.0						
≤ 50.0						

## 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 <sup>c</sup>						
	Triton X-100 em PBS	Pl. <sup>c</sup> 1U	Ph. <sup>b</sup>	Pl. <sup>c</sup> 1U Ph. <sup>b</sup>	Dn. <sup>a</sup> 1mg	Dn. <sup>a</sup> 1 mg Ph. <sup>b</sup>	Dn. <sup>a</sup> 1 mg Pl. <sup>c</sup> 1U Ph. <sup>b</sup>
% 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

<sup>a</sup> ADNase I do Roche MagNa Pure LC DNA Kit III

<sup>b</sup> Fosfolipase A<sub>2</sub>

<sup>c</sup> Plasminogénio e 10K U de estreptoquinase

<sup>d</sup> 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. <sup>a</sup> 1mg	Dn. <sup>a</sup> 1 mg Ph. <sup>b</sup>	PI. <sup>c</sup> 5U	PI. <sup>c</sup> 5U Dn. <sup>a</sup> 1mg Ph. <sup>b</sup>	PI. <sup>c</sup> 5U Dn. <sup>a</sup> 0.2mg Ph. <sup>b</sup>	PI. <sup>c</sup> 10U Dn. <sup>a</sup> 0.2mg Ph. <sup>b</sup>	
Não filtrável	+	+	+				
Filtrável com agregados de tecido observáveis				+		+	
Filtrável sem agregados de tecido observáveis					+		+

<sup>a</sup> ADNase I do Roche MagNa Pure LC DNA Kit III

<sup>b</sup> Fosfolipase A<sub>2</sub>

<sup>c</sup> Plasminogénio convertido em plasmina com 10K U de estreptoquinase