



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0804853-3 B1

(22) Data do Depósito: 29/08/2008

(45) Data de Concessão: 28/11/2017



* B R P I 0 8 0 4 8 5 3 B 1 *

(54) Título: DISPOSITIVO DE ENSAIO COMBINADO COM DISPOSITIVO DE LEITURA, E, MÉTODO DE REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO PARA DETERMINAR A PRESENÇA E/OU EXTENSÃO DE UM ANALITO EM UMA AMOSTRA DE LÍQUIDO

(51) Int.Cl.: G01N 33/50; G01N 21/78

(30) Prioridade Unionista: 01/09/2007 GB 0717045.9, 30/11/2007 US 60/991543, 31/05/2008 GB 0809994.7

(73) Titular(es): ALERE SWITZERLAND GMBH

(72) Inventor(es): STEPHEN PAUL SHARROCK

“DISPOSITIVO DE ENSAIO COMBINADO COM DISPOSITIVO DE LEITURA, E, MÉTODO DE REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO PARA DETERMINAR A PRESENÇA E/OU EXTENSÃO DE UM ANALITO EM UMA AMOSTRA DE LÍQUIDO”

5 **Campo da invenção**

A presente invenção refere-se a um dispositivo de ensaio, kit e método para determinar a presença ou extensão de um analito. Em particular, ela refere-se à determinação de um analito sobre uma faixa de concentração estendida.

10 **Antecedentes da invenção**

Dispositivos de ensaio imunológico de fluxo lateral único foram desenvolvidos e comercializados para a detecção de analitos em amostras de fluido, ver, por exemplo, a EP 291194. Tais dispositivos tipicamente compreendem um suporte poroso compreendendo um reagente de
15 ligação rotulado, imobilizável, secado, e capaz de ligar-se ao analito em questão, e um reagente de ligação imobilizado também capaz de ligar-se ao analito provida em uma zona de detecção a jusante do reagente de ligação rotulado. A detecção do reagente de ligação rotulado, imobilizado, na zona de detecção, provê uma indicação da presença de analito na amostra.

20 Alternativamente, quando o analito em interesse é um hapteno, o dispositivo de ensaio imunológico pode empregar uma reação de competição em que um analito, rotulado, ou análogo de analito, rotulado, compete com analito presente na amostra para um reagente de ligação imobilizado em uma zona de detecção. Alternativamente, o dispositivo de ensaio pode empregar uma
25 reação de inibição, por meio da qual uma substância imobilizada a ser analisada ou análogo de analito é provida em uma zona de detecção, o dispositivo de ensaio compreendendo um reagente de ligação rotulado, mobilizável, para o analito.

Um dispositivo de ensaio pode determinar mais que um analito. Por exemplo, no caso de ensaios para a determinação da presença de drogas ilícitas, o dispositivo pode ser capaz de determinar todo um painel de drogas. Tais dispositivos de ensaio imunológico de fluxo lateral são providos com múltiplas zonas de detecção, tais zonas sendo providas em um suporte de fluxo lateral simples ou suportes de fluxo lateral múltiplos.

A determinação do resultado do ensaio foi tradicionalmente realizada a olho. Todavia, tais dispositivos requerem que o resultado seja interpretado pelo usuário, o que introduz um indesejável grau de subjetividade.

Como tais, dispositivos digitais foram desenvolvidos, compreendendo um meio de detecção óptico arranjado para determinar o resultado do ensaio bem como um meio de exibição para exibir o resultado do ensaio. Leitores de ensaio digital para uso em combinação com tiras de teste de ensaio para determinar a concentração e/ou quantidade de analito em uma amostra de fluido são conhecidos com dispositivos de ensaio que compreendem um leitor de ensaio digital integral.

Luz a partir de uma fonte de luz, tal como um diodo de emissão de luz (LED), é iluminada sobre uma porção do suporte poroso e ou luz refletida ou luz transmitida é detectada por meio de um fotodetector. Tipicamente, o leitor terá mais que um LED para iluminar várias zonas do suporte, e um correspondente fotodetector é provido para cada da pluralidade de LEDS. A EP 1484601 revela um arranjo óptico para um dispositivo de leitura digital de tira de teste de fluxo lateral compreendendo um arranjo de defletor que permite a possibilidade de reduzir o um de fotodetectores no dispositivo.

Tais dispositivos são freqüentemente projetados para serem de uso único e, por conseguinte, é desejável manter os custos de tais dispositivos tão baixos quanto possível, especialmente onde caros componentes ópticos e

eletrônicos são envolvidos.

Sumário da invenção

É um objetivo, de acordo com um aspecto da invenção, prover um dispositivo de ensaio tendo um ou mais zonas compartilhadas que permitem uma redução no número de componentes ópticos que são requeridos para um dispositivo de ensaio compreendendo dois ou mais trajetos de fluxo de ensaio.

De acordo com um primeiro aspecto, a invenção provê um dispositivo de ensaio para determinar a presença e/ou extensão de um ou mais analitos em uma amostra de líquido compreendendo:

a) primeiro e segundo ensaios, cada compreendendo um trajeto de fluxo tendo uma zona de detecção para imobilizar um reagente de ligação rotulado, em que detecção de um reagente de ligação rotulado em uma ou ambas as zonas de detecção é indicativa da presença e/ou extensão de um ou mais analitos;

b) uma zona de referência compartilhada;

c) uma ou mais fontes de luz para iluminar as zonas de detecção e a zona de referência;

d) um ou mais fotodetectores para detectar luz a partir das zonas de detecção e da zona de referência, detector/s este/s que geram um sinal cuja magnitude é relacionada com a quantidade de luz detectada; e

e) meios de processamento de sinal para processar sinais a partir do/s fotodetector/es.

É um outro objetivo da invenção prover um leitor de ensaio para uso com uma ou mais tiras de teste de ensaio compreendendo dois ou mais trajetos de fluxo de ensaio, o leitor de ensaio tendo uma redução no número de componentes ópticos que são tipicamente requeridos.

De acordo com um segundo aspecto, a invenção provê um leitor de ensaio para ler o resultado de primeiro e segundo ensaios, cada

compreendendo um trajeto de fluxo, cada trajeto de fluxo compreendendo uma zona de detecção para imobilizar reagente de ligação rotulado, em que detecção de reagente de ligação rotulado em uma ou ambas as zonas de detecção são indicativas da presença e/ou extensão de um ou mais analitos, e
5 uma zona de referência compartilhada; dito leitor de ensaio compreendendo:

a) uma ou mais fontes de luz para iluminar as zonas de detecção, e a zona de referência compartilhada;

b) um ou mais fotodetectores para detectar luz a partir das zonas de detecção e da zona de referência, fotodetector/es este/s que gera/m
10 um sinal, cuja magnitude deste sinal é relacionada com a quantidade de luz detectada; e

c) meios de processamento de sinal para processar sinais a partir do/s fotodetector/es, em que o sinal obtido da zona de referência compartilhada é usado para compensar os valores dos sinais obtidos a partir
15 das zonas de detecção.

Preferivelmente, os ensaios em que o leitor é operável para ler são realizados uma ou mais tiras de teste de ensaio compreendendo primeiro e segundo trajetos de fluxo, cada compreendendo uma respectiva zona de ditas zonas de detecção.

20 O primeiro e/ou segundo ensaios podem compreender um reagente de ligação rotulado provido em uma forma imobilizável a montante da zona de detecção em um estado seco antes do uso do dispositivo.

A zona de referência compartilhada pode ser composta como parte ou do primeiro ou do segundo ensaio. Alternativamente, a zona de
25 referência pode ser provida em um trajeto de fluxo subsidiário para o primeiro e segundo ensaio. A zona de referência pode ser escolhida a partir da porção do trajeto de fluxo que não corresponde a uma zona de detecção, ou, onde um reagente rotulado seco é presente a montante da zona de detecção, a porção que não corresponde a onde o reagente rotulado seco é presente. A zona de

referência pode ser provida a jusante ou a montante da zona de detecção. A medição da zona de referência permite a medição dos níveis de fundo de luz refletida ou transmitida a partir do trajeto de fluxo. O nível de fundo pode ser afetado por meio, por exemplo, da reflexão óptica do suporte poroso, da presença de amostra de líquido, ou de componentes do ensaio, tais como um reagente de ligação rotulado. Os níveis de luz medidos na zona de detecção podem, por conseguinte, ser corrigidos com respeito aos níveis de luz de fundo para prover um sinal compensado, mais precisamente indicativo da quantidade de reagente de ligação rotulado presente na zona de detecção. A medição na zona de referência também compensa qualquer variação entre amostras de fluido aplicadas aos dispositivos de ensaio, por exemplo, amostras de urina, podem variar amplamente em cor. O valor do sinal obtido na zona de referência de um ensaio é usado para compensar o valor do sinal obtido na zona de detecção para o outro ensaio. Como tal, a zona de referência é "compartilhada" entre ambos os ensaios. A provisão de uma zona de referência compartilhada pode reduzir o número de componentes requeridos para o dispositivo de ensaio, uma vez que cada zona de referência tipicamente requereria uma fonte de luz.

O conceito de uma zona de referência compartilhada é, ao contrário, contra-intuitiva. A finalidade de uma medição de referência é de permitir variações nas leituras de antecedentes de sinais que podem se formar, dentre outros, como um resultado de variações na composição de reagente ou de tira de ensaio. Por conseguinte, a prática normal é usar uma zona de referência separada em cada ensaio, de modo que uma medição de referência "dedicada" pode ser feita para cada ensaio. Os presentes inventores verificaram, todavia, que zonas de referência separadas podem ser dispensadas e, em lugar desta, uma única zona de referência compartilhada será suficiente.

A fonte de luz é convenientemente um LED. Uma pluralidade

de LEDs pode ser empregada. Em uma forma de concretização, cada zona no ensaio (zona de detecção, referência ou controle) é iluminada por meio de um respectivo LED. O um ou mais fotodetectores pode convenientemente compreender a fotodiodo. Em uma forma de concretização preferida, um
5 único fotodiodo ou outro fotodetector é empregado. Em uma forma de concretização, estão presentes quatro LEDs e um único fotodiodo.

O dispositivo de ensaio pode ainda compreender uma zona de controle que pode ser uma única zona de controle provida como parte ou do primeiro ou do segundo ensaio. Alternativamente, a zona de controle pode
10 ser provida em um trajeto de fluxo subsidiário para o primeiro e segundo ensaio. A provisão de uma única zona de controle reduz ainda o número de fontes de luz que são necessárias. A finalidade da zona de controle é de indicar que o ensaio foi realizado corretamente, mais especificamente, que amostra de fluido foi aplicada ao dispositivo e que reagente de ligação
15 rotulado se moveu ao longo do trajeto de fluxo até alguma extensão. A zona de controle pode ser provida a jusante da zona de detecção. Uma apropriada zona de controle é revelada na EP291194 e pode compreender um reagente de ligação imobilizado para um reagente de ligação rotulado. Uma população separada de reagente de ligação rotulado pode ser provida a montante das
20 zonas de detector e controle, em que dita população separada de reagente de ligação rotulado é capaz de ser imobilizada na zona de controle, mas não fica imobilizada na zona de detecção na presença ou ausência de analito. A zona de controle é tipicamente provida a jusante da zona de detecção. O sinal obtido na zona de controle pode também ser referido com respeito ao sinal
25 obtido na zona de referência.

Assim, a medição do sinal na zona de controle provê um valor ou indicação que o teste foi realizado corretamente (ou incorretamente) para este ensaio. Se, por exemplo, a zona de controle indicar que o teste foi realizado corretamente de um ensaio, uma assunção é feita, que o teste foi

realizado corretamente no outro ensaio. Conseqüentemente, a zona de controle pode ser imaginada como sendo "compartilhada" entre o ensaios do dispositivo de ensaio. Como no caso de uma zona de referência compartilhada, a provisão de uma zona de controle única ou "compartilhada" permite que um número reduzido de componentes ópticos seja usado no dispositivo. A razão para fazer esta assunção é que é altamente provável que, se amostra de líquido foi aplicada em um trajeto de fluxo de ensaio, esta amostra de líquido foi aplicada ao outro trajeto de fluxo, especialmente então se dos dois trajetos de fluxo de ensaio são conectados, por exemplo, por meio de um meio de recepção de amostra em comum, por exemplo, um receptor de amostra poroso. Além disto, se o dispositivo de ensaio tiver sido, por exemplo, indivíduo a condições, tais como o ingresso de umidade que pode, por exemplo, resultar em deficiente ressuspensão dos reagentes mobilizáveis, ou alta temperatura, que pode desnaturar os reagentes de ligação, é provável que ambos os trajetos de fluxo serão afetados. Como no caso de uma zona de referência compartilhada, o conceito de uma zona de controle compartilhada é também contra-intuitivo. O sinal na zona de controle é calculada com respeito ao sinal na zona de referência.

As zonas de referência e controle podem ser providas como parte do mesmo ensaio ou providas como parte de diferentes ensaios. Em uma forma de concretização de exemplo, as zonas de referência e controle compartilhadas são, cada, providas em ensaios separados, por exemplo, um ensaio compreende uma zona de detecção e uma zona de referência, e o outro ensaio compreende uma zona de detecção e uma zona de controle.

De acordo com um terceiro aspecto, a invenção provê um dispositivo de ensaio for determine a presença e/ou extensão de um ou mais analitos em uma amostra de líquido compreendendo:

a) primeiro e segundo ensaios, cada compreendendo um trajeto de fluxo tendo uma zona de detecção para imobilizar um reagente de ligação

rotulado, em que detecção de um reagente de ligação rotulado em uma ou ambas as zonas de detecção é indicativa da presença e/ou extensão de um ou mais analitos;

b) uma zona de controle compartilhada;

5 C) uma ou mais fontes de luz para iluminar a zonas de detecção e a zona de controle;

d) um ou mais fotodetectores para detectar luz a partir das zonas de detecção e a zona de controle, fotodetector/es este/s que gera/m um sinal, cuja magnitude deste sinal é relacionada com a quantidade de luz
10 detectada; e

e) meios de processamento de sinal para processar sinais a partir do/s fotodetector/es.

De acordo com um quarto aspecto, a invenção provê um leitor de ensaio para ler o resultado de primeiro e segundo ensaios, cada
15 compreendendo:

um trajeto de fluxo, cada trajeto de fluxo compreendendo uma zona de detecção para imobilizar reagente de ligação rotulado, em que detecção de reagente de ligação rotulado em uma ou ambas as zonas de detecção é indicativa da presença e/ou extensão de um ou mais analitos; e
20 uma zona de controle compartilhada; dito leitor de ensaio compreendendo:

a) uma ou mais fontes de luz para iluminar as zonas de detecção, e a zona de controle compartilhada;

b) um limiar de sinal de controle armazenado;

c) um ou mais fotodetector/es para detectar luz a partir das
25 zonas de detecção e da zona de controle, fotodetector/es este/s que gera/m um sinal de controle e sinais de detecção, cuja magnitudes destes sinais são relacionadas à quantidade de luz detectada; e

d) meios de processamento de sinal para processar sinais a partir do/s fotodetector/es e para comparar o sinal obtido da zona de controle

com o limiar de sinal de controle, e para determinar que ambos os ensaios foram realizados corretamente se o sinal de controle é igual ou maior que o limiar de sinal de controle.

5 O dispositivo de ensaio e leitor de acordo com o primeiro, segundo e terceiro aspectos da invenção podem compreender um limiar de sinal de controle.

10 O limiar de sinal de controle pode ser armazenado no dispositivo ou leitor. O sinal medido a partir da zona de controle pode ser comparado com o limiar de sinal de controle para determinar se suficiente reagente de ligação rotulado foi imobilizado em dita zona. Se o valor do sinal de controle for igual a ou exceder o limiar de sinal de controle, o dispositivo ou leitor pode determinar que o ensaio foi realizado satisfatoriamente. Se o sinal de controle for menor que o limiar de sinal de controle, o dispositivo ou leitor pode determinar que o ensaio não foi realizado satisfatoriamente e
15 proverá uma mensagem de erro.

O sinal detectado a partir da zona de controle pode ser referido como um sinal obtido de uma zona de referência.

Um dispositivo de ensaio de acordo com o terceiro aspecto pode também compreender uma zona de referência compartilhada.

20 O primeiro e/ou segundo ensaios podem convenientemente compreender um reagente de ligação para um analito ou um reagente de ligação rotulado provido em uma forma imobilizada na zona de detecção.

Pelo emprego de uma zona de referência compartilhada e/ou zona de controle compartilhada, o dispositivo de ensaio da invenção provê um
25 número reduzido de zonas que precisam ser interrogadas e, conseqüentemente o número de componentes ópticos que precisam ser empregados. O uso de zonas compartilhadas é mais eficaz quando as arquiteturas de ensaio do primeiro e segundo ensaios são muito similares ou, se a zona de referência e/ou de controle for provida em um ou mais trajetos de fluxo subsidiários,

quando a arquitetura de ensaio do um ou mais trajetos de fluxo subsidiários são similares ao primeiro e segundo ensaios. Assim, por exemplo, os ensaios irão tipicamente compreender, ambos, suportes porosos de material similar (por exemplo, ambos compreendem suportes de nitrocelulose). É também
5 vantajoso usar a mesma amostra de líquido para cada ensaio. Isto pode ser convenientemente atingido por meio da provisão de uma região de aplicação de amostra em comum, a qual está em comunicação fluida com ambos os ensaios. Assim, uma única amostra de líquido aplicada no dispositivo através da região de amostra em comum pode fluir tanto através do primeiro quanto
10 do segundo ensaios. Em casos onde o primeiro e segundo ensaios não são idênticos, pode ser aceitável prover uma zona de referência compartilhada, desde que os níveis de fundo de luz que seriam detectados em cada ensaio sejam suficientemente similares uns aos outros.

Os meios de processamento de sinal podem compreender uma
15 unidade de processador central que é capaz de processar os sinais obtidos dos fotodetectores a partir das respectivas zonas e calcular valores obtidos na zona de teste com respeito à zona de referência. O dado de medição pode ser tomado em vários instantes durante o ensaio e pode ser tomado depois do dispositivo ter sido ligado, mas antes de a amostra de fluido ter sido aplicada
20 ao o dispositivo, a fim de obter valores ópticos de transmissão ou reflexão de luz no estado seco.

Um "poço" absorvente pode ser provido na extremidade distal dos trajetos de fluxo de ensaio. Um poço comum pode ser provido, ou um poço pode ser provido na extremidade distal em cada ensaio. O poço
25 absorvente pode preferivelmente compreender um material altamente absorvente, tal como, por exemplo, papel CF7 Whitman, e deve prover suficiente capacidade de absorção para remover qualquer conjugado não ligado a partir da vizinhança das zonas de detecção, da zona de referência e da zona de controle. Como uma alternativa para um tal poço, pode ser suficiente

ter um comprimento de material de fase sólida poroso, que se estende além da zona de detecção. Uma vantagem da provisão de um poço altamente absorvente é que ele remove ou substancialmente remove reagente de ligação rotulado em excesso a partir dos trajetos de fluxo dos respectivos ensaios.

- 5 Isto tem o efeito de minimizar a extensão de reagente de ligação rotulado não ligado, na vizinhança de respectivas zonas e, por conseguinte, permite que trajetos de fluxo de ensaio sejam empregados no dispositivo, os quais podem ter quantidades diferentes de reagente de ligação rotulado.

- 10 Como uma alternativa à provisão de um reagente de ligação imobilizado na zona de detecção, o reagente de ligação pode ser provido em uma forma mobilizável, que é capaz de se ligar a um complexo de reagente de ligação rotulado de analito. O reagente de ligação pode, por exemplo, ser conjugado a uma grande partícula, tal como agarose, e a zona de detecção pode compreender um filtro cujo tamanho de poro tem dimensões menores
- 15 que a grande partícula, mas maior que o tamanho do reagente de ligação rotulado, de modo que o filtro é capaz de aprisionar qualquer complexo de reagente de ligação rotulado/analito/reagente de ligação presente, qualquer reagente de ligação rotulado que não é completado pelo reagente de captura que é capaz de passar através do filtro. Ainda alternativamente, um reagente
- 20 pode ser provido em uma forma imobilizada na zona de detecção, o qual é capaz de ligar-se a um reagente de ligação rotulado, mobilizável, complexo de analito/reagente de ligação. Por exemplo, o reagente de ligação pode ser provido em uma forma mobilizável e conjugado com uma espécie de ligação, tal como biotina, o reagente imobilizado na zona de detecção sendo um
- 25 participante de ligação complementar, tal como estreptavidina.

O dispositivo de ensaio pode empregar um ensaio imunológico de sanduíche e/ou um ensaio competitivo/inibição para a determinação de um analito. Um exemplo de um ensaio imunológico de sanduíche é onde um complexo de reagente de ligação rotulado/analito/reagente de ligação é

formado. O dispositivo tipicamente compreenderá um reagente de ligação rotulado para o analito em uma forma mobilizável, provido a montante de uma zona de detecção compreendendo um reagente de ligação imobilizado para o analito. Alternativamente, em particular quando o analito de interesse
5 é um hapteno, o dispositivo de ensaio imunológico pode empregar uma reação de competição em que um analito, rotulado, ou análogo de analito, rotulado, compete com analito presente na amostra para um reagente de ligação imobilizado em uma zona de detecção. O analito, rotulado, ou o análogo de analito, rotulado, pode ser provido em uma forma mobilizável a montante a
10 partir da zona de detecção. Ainda alternativamente, o dispositivo de ensaio pode empregar uma reação de inibição em que um analito, imobilizado, ou análogo de analito, é provido na zona de detecção, o dispositivo de ensaio compreendendo um reagente de ligação rotulado, mobilizável, para o analito.

O termo “trajeto de fluxo” para as finalidades desta invenção
15 refere-se a um substrato que é capaz de transportar um líquido de uma primeira posição para uma segunda posição e pode ser, por exemplo, um canal capilar, uma via microfluídica, ou um suporte poroso, tal como um suporte poroso de fluxo lateral. O suporte poroso pode compreender um ou uma pluralidade de materiais de suporte poroso, os quais podem se sobrepor
20 em um arranjo linear ou empilhado ou que são fluidamente conectados. Os materiais de suporte poroso podem ser os mesmos ou diferentes. O primeiro e segundo ensaios podem ser provido em substratos separados ou eles podem ser providos em um substrato em comum, de modo que líquido sendo transportado ao longo de um trajeto de fluxo do primeiro ensaio não é capaz
25 de cruzar o trajeto de fluxo do segundo ensaio. Por exemplo, o primeiro e segundo ensaios podem ser providos sobre o mesmo suporte poroso de modo que o primeiro e segundo trajetos de fluxo são isolados um do outro. Isto pode ser atingido, por exemplo, por meio de partes de corte a laser do suporte poroso para torná-lo não poroso, separando assim o primeiro e segundo

ensaios. Alternativamente, um material de bloco não poroso pode ser aplicado ao longo de uma tira para prover dois (tipicamente essencialmente paralelos) trajetos de fluxo sobre o mesmo suporte poroso.

Em particular, o trajeto de fluxo pode ser um suporte poroso de fluxo lateral. Materiais apropriados que podem ser empregados como um suporte poroso incluem nitrocelulose, fibra de acetato, celulose ou derivados de celulose, poliéster, poliolefina ou fibra de vidro. O suporte poroso pode compreender nitrocelulose. Isto tem a vantagem que um reagente de ligação pode ser imobilizado firmemente sem anterior tratamento químico. Se o material de fase sólida poroso compreender papel, por exemplo, a imobilização do anticorpo na segunda zona precisa ser realizada por meio de acoplamento químico usando, por exemplo, CNBr, carbonildiimidazol, ou cloreto de tresila.

O termo "reagente de ligação" refere-se a um membro de um par de ligação, isto é, duas moléculas diferentes em que uma das moléculas se liga com a segunda molécula através de meios químicos e/ou físicos. As duas moléculas são relacionadas no sentido que sua ligação uma com a outra é de modo que elas são capazes de distinguir seu parceiro de ligação a partir de outros constituintes de ensaio tendo características similares. Os membros do par de ligação são referidos como ligante e receptor (antiligante), um membro de par de ligação e participante de par de ligação, e similares. Uma molécula pode também ser um membro de par de ligação para uma agregação de moléculas; por exemplo, um anticorpo elevado contra um imuno complexo de um segundo anticorpo e seu correspondente antígeno pode ser considerado ser um membro de par de ligação para o imuno complexo.

Em adição a membros de par de ligação de antígeno e anticorpo, outros pares de ligação incluem, como exemplos, sem limitação, biotina e avidina, carboidrato e lectinas, seqüências de nucleótidos complementares, seqüências de peptídeos complementares, moléculas de

efetores e receptores, cofatores de enzima e enzimas, inibidores de enzima e enzimas, uma seqüência de peptídeos e um anticorpo específico para a seqüência ou a proteína inteira, ácidos de bases poliméricos, corante e ligadores de proteína, peptídeos e específicos ligadores de proteína (por exemplo, ribonuclease, peptídeo-S e proteína-S de ribonuclease), e similares. Além disto, específicos pares de ligação podem incluir membros que são análogos do específico membro de ligação original.

"Rótulo" quando usado no contexto de um reagente de ligação rotulado, refere-se a qualquer substância que é capaz de produzir um sinal que pode ser detectado por meios visuais ou instrumentais. Vários rótulos apropriados para uso na presente invenção incluem rótulos que produzem sinais ou através de meios químicos ou de meios ópticos, tais como, que são opticamente detectáveis. Tais rótulos incluem enzimas e substratos, cromogênios, catalisadores, compostos fluorescentes, compostos quimioluminescentes, espécies eletroativas, moléculas de corante, rótulos radioativos e rótulos de partícula. O analito propriamente dito pode ser inerentemente capaz de produzir um sinal detectável. O rótulo pode ser covalentemente fixado ao reagente de ligação. Em particular, o rótulo pode ser escolhido a partir de um que é opticamente detectável.

O rótulo pode compreender uma partícula, tal como ouro, prata, partículas não metálicas coloidais, tais como selênio ou telúrio, partículas tingidas ou coloridas, tais como uma partícula de polímero incorporando um corante, ou um sol de corante. O corante pode ser de qualquer cor apropriada, por exemplo, azul. O corante pode ser fluorescente. Sóis de corante podem ser preparados a partir de corantes hidrófobos comercialmente disponíveis, tais como Foron Blue SRP (Sandoz) e Resoling Blue BBLS (Bayer). Rótulos de polímero apropriados podem ser escolhidos de uma faixa de polímeros sintéticos, tais como poliestireno, tolueno de polivinilo, ácido poliestireno-acrílico e poliacroleína.

Os monômeros usados são normalmente insolúveis em água, e são emulsificados em tensoativo aquoso de modo que micelas de monômero são formadas, as quais são então induzidas a se polimerizarem por meio da adição de iniciador para a emulsão. Partículas de polímero substancialmente esféricas são produzidas. Uma faixa de tamanho ideal para tais partículas de polímero é de aproximadamente 0,05 gm até aproximadamente 0,5 gm. De acordo com uma forma de concretização de exemplo, o rótulo é uma partícula polimérica azul.

Os reagentes de ligação secos podem ser providos sobre um material de suporte poroso provido a montante de um material de suporte poroso compreendendo a zona de detecção. O material de suporte poroso a montante deve ser macroporoso. O material de suporte macroporoso deve ser de ligação de baixa ou de nenhuma proteína, ou deve ser facilmente conformado em bloco por meio de reagentes, tais como BSA ou PVA, para minimizar ligação não específica e para facilitar livre movimento do reagente rotulado depois do corpo macroporoso ter ficado umidificado com a amostra de líquido. O material de suporte macroporoso pode ser pré-tratado com um agente tensoativo ou solvente, se necessário, para torná-lo mais hidrofílico e para promover rápida absorção da amostra de líquido. Apropriados materiais para um suporte macroporoso incluem materiais plásticos tais como polietileno e polipropileno, ou outros materiais tais como papel ou fibra de vidro. No caso em que o reagente de ligação rotulado é rotulado com uma partícula detectável, o corpo macroporoso pode ter um tamanho de poro pelo menos dez vezes maior que o tamanho de partícula máximo do rótulo de partícula. Maiores tamanhos de poro fornecem melhor liberação do reagente rotulado. Como uma alternativa para um suporte macroporoso, o reagente de ligação rotulado pode ser provido sobre um substrato não poroso provido a montante da zona de detecção, dito substrato não poroso formando parte do trajeto de fluxo.

O suporte poroso pode compreender um suporte macroporoso de fibra de vidro provido a montante de e sobrepondo em sua extremidade distal um suporte poroso de nitrocelulose.

5 A amostra de líquido pode ser derivada de qualquer fonte, tal como uma fonte industrial, ambiental, agrícola, ou biológica. A amostra pode ser derivada ou consistir de uma fonte fisiológica incluindo sangue, soro, plasma, fluido intersticial, saliva, escarro, líquido de cristalino ocular, suor, urina, leite, mucos, líquido sinovial, líquido peritonal, exsudados transversais, exsudados faríngeais, lavagem bronquioalveolares, aspirações
10 traqueais, líquido cefalorraquiano, sêmen, muco cervical, secreções vaginais ou uretrais e líquido amniótico. Em particular, a fonte pode ser humana e em particular a amostra pode ser urina.

"Luz", quando usada aqui, é destinada a abranger qualquer radiação eletromagnética apropriada, independente de comprimento de onda,
15 Não obstante isto, a invenção é principalmente destinada a utilizar luz na parte visível do espectro, e "fonte de luz" e "fotodetector" devem ser entendidos, por conseguinte, como abrangendo respectivamente qualquer fonte de, e meios para detectar, radiação eletromagnética, mas especialmente que se relacionam com radiação de comprimentos de onda visíveis (isto é, na
20 faixa de aproximadamente 390-800 nm).

O/s fotodetector/es irá/irão detectar luz a partir de uma ou mais zonas do dispositivo de ensaio. A luz pode atualmente se originar a partir daquelas zonas, por exemplo, se o rótulo é fluorescente ou similar. Mais normalmente, todavia, o/s fotodetector/es irá/irão detectar luz que parece
25 emanar a partir daquelas zonas isto é, luz que se origina a partir da fonte de luz e é refletida e/ou transmitida por meio da zona sobre o fotodetector.

Os analitos incluem, mas não são limitados a, toxinas, compostos orgânicos, proteínas, peptídeos, microorganismos, bactérias, vírus, amino ácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, hormônios, esteróides,

vitaminas, drogas (incluindo aquelas administradas para fins terapêuticos bem como aquelas administradas para fins ilícitos), poluentes, pesticidas, e metabólitos de ou anticorpos para qualquer das substâncias acima. O termo analito também inclui quaisquer substâncias antigênicas, haptenos, anticorpos, macromoléculas, e combinações dos mesmos.

O dispositivo de ensaio pode determinar um ou mais analitos.

O dispositivo de ensaio pode ser capaz de determinar a quantidade ou presença de um analito sobre uma extensa faixa de substâncias a serem examinadas, em que o primeiro ensaio é capaz de determinar o nível de analito em uma menor faixa de concentração e o segundo ensaio é capaz de determinar o nível de analito em uma amostra de líquido em uma maior faixa de concentração.

Existem várias maneiras em que um ensaio pode ser preparado a fim de medir o analito em uma maior faixa de substâncias a serem examinadas.

Por exemplo, o dispositivo de ensaio pode compreender um ensaio de renovação compreendendo um reagente de ligação rotulado para o analito e um reagente de renovação de ligação para o analito, provido a montante da zona de detecção. O reagente de renovação de ligação serve para remover excesso de analito e reduzir a sensibilidade do ensaio. Isto tem o efeito de aumentar a faixa dinâmica do ensaio, permitindo medição em maiores níveis de analito. O reagente de renovação de ligação pode ser imobilizado, imobilizável ou ambos. O reagente de renovação de ligação pode ser ou provido na mesma região do suporte poroso que o reagente de ligação rotulado mobilizável, a montante dele ou a jusante dele. O reagente de renovação de ligação pode se ligar à mesma região de ligação do analito que o reagente de ligação rotulado mobilizável ou a uma diferente região do analito que o reagente de ligação rotulado. O reagente de renovação pode ter uma diferente afinidade ao analito que o reagente de ligação rotulado

mobilizável do segundo ensaio. Em uma forma de concretização de exemplo, o reagente de renovação de ligação tem uma mais alta afinidade ao analito que o reagente de ligação mobilizável do segundo ensaio. A quantidade de reagente de renovação de ligação pode ser variada para alterar a sensibilidade do ensaio para a concentração de analito. O aumento da quantidade de reagente de renovação de ligação presente reduz a sensibilidade do ensaio devido ao fato que o reagente de renovação de ligação é capaz de ligar mais analito, efetivamente reduzindo a proporção de reagente de ligação rotulado que é capaz de se ligar com a zona de detecção.

A fim de aumentar a faixa dinâmica do ensaio, o dispositivo de ensaio pode, por exemplo, compreender múltiplas zonas de detecção, em que cada zona de detecção é capaz de ligar o analito em diferentes níveis de concentração de analito. Por exemplo, as respectivas zonas podem compreender reagente de ligação para o analito tendo afinidades diferentes ao analito.

Outras maneiras para aumentar a faixa dinâmica do ensaio são prover um dispositivo de ensaio compreendendo um ensaio de ligação em sanduíche e um ensaio de competição ou inibição. Por exemplo, o ensaio de sanduíche pode ser ensaio de alta sensibilidade, mais precisamente, ele é capaz de medir analito em uma menor faixa de concentração e o ensaio de inibição ou competição pode ser um ensaio de baixa sensibilidade, mais precisamente, ele é capaz de medir analito em uma maior faixa de concentração. Uma outra maneira é alterar a afinidade ou quantidade do reagente de ligação rotulado ou do reagente imobilizado na zona de detecção.

Um reagente de ligação de alta afinidade uma maior sensibilidade de analito que um reagente de ligação de menor afinidade. Similarmente, um reagente de ligação de mais baixa concentração terá uma menor sensibilidade de analito que uma maior concentração de reagente de ligação. A sensibilidade de ensaio pode ser alterada por meio da alteração da relação entre reagente de

ligação e o rótulo do reagente de ligação rotulado. Se uma partícula é usada como o rótulo, então a quantidade do reagente de ligação aplicado ao rótulo pode ser alterada para alterar a sensibilidade de ensaio. Uma outra maneira de manipular a sensibilidade de um ensaio é variar a quantidade do rótulo usado no ensaio. Por exemplo, a sensibilidade de um ensaio pode ser abaixada por meio da redução da relação entre reagente de ligação e espécies rotuladas para o reagente de ligação rotulado.

Um outro meio de manipular a sensibilidade de um ensaio é alterar a densidade óptica de um rótulo. A sensibilidade de ensaio pode ser abaixada por meio do uso de um rótulo com uma baixa densidade óptica. Isto pode ser atingido, por exemplo, por meio da provisão de um rótulo de partícula de polímero tendo uma baixa concentração de corante ou por meio do uso de um rótulo colorido que é menos sensível a um detector óptico.

Ainda, uma outra maneira de medir altos níveis de analito é empregar um reagente de ligação rotulado, não particulado. Altos níveis de analito, quando medidos por meio de um ensaio de ligação em sanduíche, requerem altos níveis de reagente de ligação. No caso em que o rótulo é um rótulo de partícula, a provisão de altos níveis de analito dentro ou sobre o suporte poroso pode originar impedimento estérico, resultando em deficiente sensibilidade de ensaio. Em contraste, em menores níveis de analito, o uso de um reagente de ligação rotulado, não particulado, pode originar um baixo sinal, devido à baixa densidade óptica. Todavia, em altos níveis de analito, rótulos não-particulados podem estar presentes em níveis suficientemente altos para serem facilmente detectados. Um exemplo de um rótulo de não-particulado opticamente detectável pode ser um corante. O corante pode ser fluorescente.

A sensibilidade de ensaio pode ser influenciada por meio da taxa de fluxo do suporte poroso. Uma maneira de reduzir a sensibilidade do ensaio é empregar um suporte poroso (tal como nitrocelulose) tendo uma mais

alta taxa de fluxo.

A sensibilidade de um ensaio pode ser ainda manipulada por meio da modificação da taxa em que o reagente de ligação rotulado é liberado a partir de sua origem. Uma outra maneira de reduzir sensibilidade de analito é prover uma rápida liberação do reagente de ligação rotulado a partir do suporte poroso durante contato com a amostra de líquido. A liberação do reagente de ligação rotulado pode ser modificada por meio da provisão de açúcares, proteínas ou outras substâncias poliméricas, tais como metilcelulose dentro do dispositivo.

De acordo com uma forma de realização particular, o dispositivo de ensaio compreende um ensaio de renovação compreendendo um segundo reagente de ligação mobilizável (renovação) para o analito e a reagente de ligação mobilizável para o analito, provido a montante da zona de detecção.

De acordo com uma forma de realização particular, o primeiro ensaio é capaz de medir analito em uma menor faixa de concentração de analito e o segundo ensaio é capaz de medir analito em uma maior faixa de concentração de analito. O primeiro ensaio pode compreender uma zona de referência compartilhada e o segundo ensaio pode compreender uma zona de controle compartilhada.

O primeiro ensaio pode compreender um reagente de ligação rotulado provido a montante de uma zona de detecção e o segundo ensaio pode compreender um reagente de ligação rotulado e um reagente de ligação de renovação mobilizável provido a montante de uma zona de detecção. O reagente de renovação de ligação pode ser provido na mesma posição ou na região do reagente de ligação rotulado a montante da zona de detecção.

Em particular, o analito a ser determinado pode ser hCG e, neste caso, a amostra de líquido pode ser urina.

O dispositivo de ensaio pode determinar um único analito, tal

como hCG, em que o primeiro ensaio é capaz de determinar o nível de hCG em uma amostra de líquido em uma primeira faixa de concentração e o segundo ensaio é capaz de determinar o nível de hCG em uma amostra de líquido em uma segunda faixa de concentração.

5 A fim de medir um crescente analito sobre uma certa faixa, é importante assegurar que existe suficiente reagente de ligação rotulado presente de modo que o sinal de ensaio não se torne saturado. A medição de grandes quantidades de analito freqüentemente requer um correspondente aumento na quantidade de reagente de ligação rotulado para evitar o assim
10 chamado "efeito de gancho" ou saturação do sinal de ensaio com crescente analito. Variação no sinal de controle foi mostrado que ocorre particularmente no caso onde existe uma elevada quantidade de reagente de ligação presente.

 Onde os primeiro e segundo ensaios são providos tendo
15 diferentes quantidades de reagente de ligação rotulado, foi mostrado que é vantajoso prover a zona de referência como parte do ensaio tendo um menor nível de reagente de ligação rotulado.

 De acordo com uma forma de concretização, o dispositivo de ensaio é capaz de medir analito em uma maior faixa de substâncias a serem
20 examinadas. Existem várias maneiras de prover um tal dispositivo.

 Por exemplo, o dispositivo de ensaio pode compreender um reagente de ligação rotulado para o analito e um segundo reagente de ligação para o analito, provido a montante da zona de detecção. O segundo reagente de ligação serve para remover excesso de analito e reduzir a sensibilidade do
25 ensaio. Isto tem o efeito de aumentar a faixa dinâmica do ensaio, permitindo medição em mais altos níveis de analito. O segundo reagente de ligação pode ser imobilizado, mobilizável ou ambos. O segundo reagente de ligação pode ser provido ou na mesma região do suporte poroso que o reagente de ligação rotulado mobilizável, a montante dela ou a jusante dela. O segundo reagente

de ligação pode ligar-se à mesma região de ligação do analito que o reagente de ligação rotulado mobilizável ou a uma diferente região do analito que o reagente de ligação rotulado. O segundo reagente pode ter uma diferente afinidade ao analito que o reagente de ligação rotulado mobilizável do
5 segundo ensaio. Em uma forma de concretização de exemplo, o segundo reagente de ligação tem uma maior afinidade ao analito que o reagente de ligação mobilizável do segundo ensaio. A quantidade do segundo reagente de ligação pode ser variada para alterar a sensibilidade do ensaio à concentração do analito. O aumento da quantidade do segundo reagente de ligação presente
10 diminui a sensibilidade do ensaio devido ao fato que o segundo reagente de ligação é capaz de ligar mais analito, efetivamente reduzindo a proporção de reagente de ligação rotulado que é capaz de ligar-se à zona de detecção.

A fim de aumentar a faixa dinâmica do ensaio, o dispositivo de ensaio pode, por exemplo, compreender múltiplas zonas de detecção, em que
15 cada zona de detecção é capaz de ligar analito em diferentes níveis de concentração de analito. Por exemplo, as respectivas zonas podem compreender reagente de ligação para o analito tendo diferentes afinidades ao analito.

Outras maneiras de aumentar a faixa dinâmica do ensaio são
20 prover um dispositivo de ensaio compreendendo um ensaio de ligação em sanduíche e um ensaio de competição ou inibição. Por exemplo, o ensaio de sanduíche pode ser ensaio de alta sensibilidade, mais precisamente ele é capaz de medir analito em uma menor faixa de concentração e o ensaio de inibição ou competição pode ser um ensaio de baixa sensibilidade, mais precisamente
25 ele é capaz de medir analito em uma maior faixa de concentração. Uma outra maneira é alterar a afinidade ou quantidade do reagente de ligação rotulado ou do reagente imobilizado na zona de detecção. Um reagente de ligação de alta afinidade terá uma maior sensibilidade de analito que um reagente de ligação de menor afinidade. Similarmente, uma baixa concentração de reagente de

ligação terá uma menor sensibilidade de analito que uma alta concentração de reagente de ligação. A sensibilidade de ensaio pode ser alterada por meio da alteração da relação entre reagente de ligação e o rótulo do reagente de ligação rotulado. Se uma partícula for usado como o rótulo, então a
5 quantidade do reagente de ligação aplicada ao rótulo pode ser alterada para alterar sensibilidade de ensaio. Uma outra maneira de manipular a sensibilidade de um ensaio é variar a quantidade do rótulo usado no ensaio. Por exemplo, a sensibilidade de um ensaio pode ser reduzida por meio da redução da relação entre reagente de ligação e espécies rotuladas para o
10 reagente de ligação rotulado.

Um outro meio de manipular a sensibilidade de um ensaio é alterar a densidade óptica de um rótulo. A sensibilidade de ensaio pode ser reduzida por meio do uso de um rótulo com uma baixa densidade óptica. Isto pode ser atingido, por exemplo, por meio da provisão de um rótulo de
15 partícula de polímero tendo uma baixa concentração de corante ou por meio do uso de um rótulo colorido que é menos sensível a um detector óptico.

Ainda, uma outra maneira de medir altos níveis de analito é empregar um reagente de ligação rotulado, não particulado. Altos níveis de analito, quando medidas por meio de um ensaio de ligação em sanduíche,
20 requerem altos níveis de reagente de ligação. No caso em que o rótulo é um rótulo de partícula, a provisão de altos níveis de analito dentro ou sobre o suporte poroso pode originar impedimento estérico, resultando em deficiente sensibilidade de ensaio. Em contraste, em menores níveis de analito, o uso de um reagente de ligação rotulado não particulado pode originar um baixo sinal
25 devido à baixa densidade óptica. Todavia, em altos níveis de analito, rótulos de não-partícula pode estar presentes em níveis suficientemente altos a serem facilmente detectados. Um exemplo de um rótulo não-particulado, opticamente detectável, pode ser um corante. O corante pode ser fluorescente.

A sensibilidade de ensaio pode ser influenciada por meio da taxa de fluxo do suporte poroso. Uma maneira de reduzir a sensibilidade do ensaio é empregar um suporte poroso (tal como nitrocelulose) tendo uma mais alta taxa de fluxo.

- 5 A sensibilidade de um ensaio pode ser ainda manipulada por meio da modificação da taxa em que o reagente de ligação rotulado é liberado a partir de sua origem. Uma outra maneira de reduzir a sensibilidade de analito é prover uma rápida liberação do reagente de ligação rotulado a partir do suporte poroso durante contato com a amostra de líquido. A liberação do
- 10 reagente de ligação rotulado pode ser modificada por meio da provisão de açúcares, proteínas ou outras substâncias poliméricas tais como metilcelulose dentro do dispositivo.

De acordo com uma forma de realização particular, o dispositivo de ensaio compreende um segundo reagente de ligação

15 mobilizável para o analito e a reagente de ligação mobilizável para o analito, provido a montante da zona de detecção. O segundo reagente de ligação pode ser provido na mesma posição ou posição similar a montante da zona de detecção que o reagente de ligação rotulado.

De acordo com uma forma de realização particular, o

20 dispositivo de ensaio compreende dois ensaios, cada compreendendo um trajeto de fluxo, em que o primeiro ensaio é capaz de medir analito em uma menor faixa de concentração de substancia e o segundo ensaio é capaz de medir analito em uma maior faixa de analito. O primeiro ensaio pode compreender uma zona de referência compartilhada e o segundo ensaio pode

25 compreender uma zona de controle compartilhada.

O dispositivo de ensaio da invenção pode ser usado para medir a extensão ou presença de hCG. sobre uma faixa de concentração estendida. A faixa pode variar de entre aproximadamente 10 mIU até aproximadamente 250.000 mIU.

O segundo ensaio pode compreender um reagente de ligação rotulado para o analito e um segundo reagente de ligação para o analito. O primeiro ensaio pode compreender reagente de ligação rotulado para o analito, provido a montante da zona de detecção.

5 O dispositivo de ensaio pode compreender um ou mais outros valores de limiar de medição para indicar o nível de analito em uma certa faixa de substâncias a serem examinadas. Em uma forma de concretização, o dispositivo de ensaio compreende um primeiro e segundo limites de medição, em que um sinal de medição de analito menor que o primeiro limiar de
10 medição é indicativo da ausência de analito ou da ausência de analito acima de um certo nível e em que um sinal de medição de analito maior que o segundo limiar é indicativo do nível de analito em uma segunda faixa de concentração e um sinal de medição menor que o segundo limiar é indicativo do nível de analito em um primeira faixa de concentração. De acordo com
15 uma forma de realização particular, o dispositivo de ensaio adicionalmente compreende um terceiro limiar de medição, em que um sinal de medição de analito é maior que o terceiro limiar é indicativo do nível de analito em uma terceira faixa de concentração.

Em particular, o dispositivo de ensaio pode ser capaz de medir
20 a presença e extensão do analito, analito hCG, em uma amostra de líquido, em particular urina, de um indivíduo mamífero fêmea. O dispositivo de ensaio pode compreender um primeiro limiar de medição, em que níveis de sinal de analito hCG menores que o limiar são indicativos ou de não estar grávida e em que níveis de sinal de analito hCG maiores ou iguais ao primeiro limiar de
25 medição são indicativa de estar grávida, em que o dispositivo compreende pelo menos um outro limiar de medição. Em adição, o dispositivo de ensaio pode prover uma indicação da extensão de gravidez. O dispositivo de ensaio pode prover uma indicação, baseada em tempo, para o usuário, tal como a extensão de gravidez em unidades de dias ou semanas.

Um tempo de desenvolvimento de ensaio total, típico, para um teste de ensaio, para a determinação de hCG em urina é 3 minutos.

É um objetivo desejável da invenção reduzir o número de componentes ópticos; isto pode ser convenientemente atingido, onde a zona de referência é provida como parte de um ensaio e a zona de controle é provido como parte do outro ensaio. De acordo com uma forma de concretização, a zona de referência é provida como parte de um primeiro ensaio tendo um menor nível de reagente de ligação rotulado e a zona de controle é provida como parte de um segundo ensaio tendo um maior nível de reagente de ligação.

De acordo com uma forma de concretização, o dispositivo de ensaio compreende quatro fontes de luz, em que as fontes de luz são arranjadas para iluminar as zonas de detecção do primeiro e segundo ensaio e as zonas de controle e referência compartilhadas, cada zona sendo iluminada por meio de uma respectiva fonte de luz. Um ou mais fotodetectores podem ser posicionados para detectar luz refletida e/ou transmitida a partir das respectivas zonas. De acordo com uma forma de concretização, um único fotodetector pode ser empregado para detectar luz a partir de todas das zonas. Isto pode ser atingido por meio de, por exemplo, iluminação das respectivas zonas seqüencialmente de modo que o dispositivo é capaz de reconhecer de qual zona luz detectada no fotodetector está emanando. O processo de iluminação seqüencial pode ser repetido com uma frequência fixa ou variada durante a duração do ensaio, de modo que os níveis de sinal sobre tempo em cada zona podem ser monitorados. Em adição, a alteração em níveis de luz detectada a partir de uma ou mais zonas pode ser usada para determinar se e quando a amostra de fluido foi aplicada ao dispositivo e para determinar a taxa de fluxo da amostra de líquido ao longo do dispositivo. A determinação da taxa de fluxo pode ser usada como uma outra verificação de controle de qualidade, por exemplo, o ensaio pode ser rejeitada se a taxa de fluxo é ou

maior que ou menor que níveis ajustados. Apropriados método e meios de detecção de taxa de fluxo são revelados pela EP 1484641.

O reagente de ligação rotulado tipicamente se acumula na zona de detecção sobre um período de tempo para um ensaio imunológico em sanduíche e, assim, a taxa de aumento de sinal sobre tempo pode ser monitorada. O dispositivo pode determinar o resultado depois de o sinal ter atingido o equilíbrio ou, mais tipicamente, antes de a reação ter atingido o equilíbrio. O dispositivo pode prover um resultado quantitativo, tal como um valor individual, um resultado ou faixa semi-quantitativo tal como 1-10, 11-20 e assim por diante, ou um resultado qualitativo tal como SIM/NÃO. O dispositivo pode determinar o resultado com respeito a um ou mais limiares de sinal. O dispositivo pode ter um tempo de medição fixo ou prover um resultado antecipado antes do tempo de medição fixo ter decorrido. Um resultado antecipado pode, por exemplo, ser dado no caso onde o dispositivo determinar que o nível de sinal nunca irá exceder um limiar particular ou exceder um limiar particular em um estágio antecipado. Nestes casos particulares, o dispositivo pode chamar uma medição antecipada de NÃO ou SIM, indicando a ausência ou presença de analito com respeito a um nível de base particular (que pode ser zero). Um dispositivo de ensaio empregando um método de determinação de resultado antecipado é revelado por meio da EP 1464613.

O dispositivo de ensaio pode ser usado para determinar se um indivíduo está grávido ou não (mais precisamente se a amostra de líquido contém hCG acima de um certo nível) e pode também empregar ainda limiares indicando para o usuário a extensão de gravidez. A extensão de gravidez pode ser exibida em termos de uma medição baseada em tempo ou medição baseada em concentração.

O dispositivo de ensaio irá tipicamente compreender uma caixa. A caixa pode ser impermeável a fluido e construída a partir de um

apropriado matéria plástica, tal como ABS. O dispositivo de ensaio pode ainda compreender um membro de recepção de amostra para receber a amostra de fluido. Um membro de recepção de amostra pode se estender a partir da caixa.

5 A caixa pode ser construída de um material impermeável a fluido. A caixa irá também desejavelmente excluir luz ambiente. A caixa ou alojamento será considerada substancialmente como excluindo luz ambiente, se menos que 10%, preferivelmente menos que 5%, e mais preferivelmente menos que 1 %, da luz visível incidente sobre o exterior do dispositivo
10 penetrar no interior do dispositivo. Um material de plástico sintético, impermeável a luz, tal como policarbonato, ABS, poliestireno, poliestirol, polietileno de alta densidade, ou polipropileno contendo um apropriado elemento de bloqueio de luz é uma escolha apropriada para uso na fabricação da caixa. Uma abertura pode ser provida no exterior da caixa, a qual se
15 comunica com o ensaio provido dentro do espaço interior na caixa. Alternativamente, a abertura pode servir para permitir que um receptor de amostra poroso se estenda a partir da caixa para uma posição externa à caixa.

 Também provido dentro da caixa estará tipicamente uma fonte de energia. O dispositivo irá tipicamente compreender um meio de exibição
20 para exibir o resultado do ensaio bem como um meio de memória para armazenar dados. Convenientemente, o meio de exibição compreende um LCD.

 O meio de exibição pode ainda exibir informação, tal como uma mensagem de erro, detalhes pessoais, cronômetro, para informar o
25 usuário o tempo em que o ensaio foi medido. A informação exibida por meio do ensaio pode ser indicada em palavras, números ou símbolos, em qualquer fonte, alfabeto ou linguagem, por exemplo, "positivo", "negativo", "+", "-", "grávida", "não grávida", "consultar seu médico", "repetir o teste".

 O dispositivo de ensaio pode ainda compreender um receptor

de amostra, compreendendo um membro poroso de recepção de amostra, em conexão de fluido com e a montante do um ou ambos os trajetos de fluxo de ensaio. O dispositivo de ensaio pode compreender mais que um trajeto de fluxo de ensaio, cada compreendendo uma zona de detecção, em cujo caso um

5 único membro poroso de recepção de amostra pode ser provido, o qual é comum aos múltiplos trajetos de fluxo de ensaio. Assim, uma amostra de fluido aplicada ao membro poroso do dispositivo é capaz de se deslocar ao longo dos trajetos de fluxo dos respectivos ensaios para as respectivas zonas de detecção. O membro poroso pode ser provido dentro de uma caixa ou

10 pode pelo menos parcialmente se estender para fora de dita caixa e pode servir, por exemplo, para coletar uma corrente de urina. O membro poroso pode atuar como um reservatório de fluido. O membro poroso pode ser feito de qualquer material absorvente, poroso ou material fibroso capaz de absorver líquido rapidamente. A porosidade do material pode ser unidirecional (isto é,

15 com poros ou fibras correndo totalmente ou predominantemente em paralelo a um eixo geométrico do membro) ou multidirecional (omnidirecional, de modo que o membro tem uma estrutura amorfa similar a esponja). Material plástico poroso, tal como polipropileno, polietileno (preferivelmente de peso molecular muito alto), fluoreto de polivinilideno, acetato de vinil de etileno,

20 acrilonitrilo e politetrafluoro-etileno pode ser usado. Outros materiais apropriados incluem fibra de vidro. A provisão de um membro poroso de recepção de amostra em comum permite que uma única amostra seja provida simultaneamente aos trajetos de fluxo do primeiro e segundo ensaios e ainda aumenta a efetividade de prover uma zona de referência compartilhada e/ou

25 zona de controle compartilhada.

Em um quinto aspecto, a invenção provê um método de realizar um ensaio para determinar a presença e/ou extensão de um ou mais analitos, o método compreendendo a etapa de contatar uma amostra de líquido com um dispositivo de ensaio de acordo com o primeiro e terceiro aspectos da

invenção.

Visão geral das figuras

A figura 1 é uma vista de um dispositivo de ensaio de acordo com a invenção;

5 a figura 2 é uma vista esquemática dos trajetos de fluxo de ensaio de acordo com uma forma de concretização de exemplo de acordo com a invenção;

a figura 3 é uma vista do arranjo de fontes de luz e fotodetector da forma de concretização mostrada na figura 2;

10 a figura 4 é uma vista de seção transversal esquemática de parte de uma forma de concretização do dispositivo de ensaio ilustrando as posições relativas de alguns dos componentes de ensaio;

as figuras 5a e 5b são vistas do lado inferior de um arranjo de defletor também mostrando alguns dos componentes ópticos da forma de concretização mostrada na figura 3; e

15 a figura 6 é uma vista superior da parte da forma de concretização do dispositivo de ensaio, ilustrada nas figuras precedentes, e ilustrando uma tira de teste de fluxo lateral *in situ* no dispositivo de ensaio.

Descrição detalhada

20 Uma vista superior externa de um dispositivo de ensaio é mostrada na figura 1. O dispositivo (10) é alongado, tendo um comprimento de aproximadamente 14 cm e uma largura de aproximadamente 25 mm. A caixa (11) pode ser formada de uma apropriada caixa impermeável a líquido, tal como policarbonato, ABS, poliestireno, polietileno de alta densidade, ou

25 polipropileno. O receptor de amostra poroso externo (12) pode ser formado de qualquer material absorvente, poroso ou fibroso, capaz de absorver líquido rapidamente. Também mostrado é um visor de LCD (15) para exibir os resultados do ensaio. Também providos dentro do dispositivo de ensaio e não mostrados, são os trajetos de fluxo de ensaio, fontes de luz, fotodetector, uma

fonte de energia e associados componentes eletrônicos.

A figura 2 mostra o leiaute do fotodetector e dos suportes porosos de ensaio individuais de um dispositivo de ensaio de acordo com uma forma de concretização de exemplo. O dispositivo de ensaio (20) tem uma região de aplicação de amostra em comum (21), a qual fluidamente conecta o primeiro e segundo ensaios (22) e (23). Um único fotodetector (4) é provido entre os dois ensaios para detectar luz a partir das respectivas zonas. As zonas (24) e (25) correspondem respectivamente a uma zona de detecção e de controle sobre o primeiro ensaio (22). As zonas (26) e (27) correspondem respectivamente a uma zona de detecção e de referência sobre o segundo ensaio (23). Não mostrados são os correspondentes quatro LEDs, os quais, cada, iluminam uma respectiva zona através de janelas apropriadamente posicionadas.

A figura 3 mostra uma vista do arranjo de acordo com uma forma de concretização de exemplo compreendendo um único fotodetector (32) e quatro LEDs (31). A área ativa do fotodetector é 1,5 mm x 1,5 min.

A figura 4 mostra uma vista esquemática em seção transversal do dispositivo de ensaio (40) mostrando as posições relativas de alguns dos componentes. Luz a partir do LED (41) ilumina uma zona de tira (42) e luz refletida a partir da zona é detectada por meio do fotodetector (44). Similarmente, luz a partir do LED (45) ilumina uma zona de tira (46) e luz refletida é detectada por meio do fotodetector. Providos são divisores (47) que previnem que luz a partir do LED incida diretamente sobre o fotodetector. Também provido é um membro inclinado (48) que serve para prevenir iluminação da tira (46) por meio do LED (41) e, correspondentemente, a iluminação da tira (42) por meio de LED (45), enquanto que permite que luz refletida a partir das respectivas tiras de teste seja detectada por meio do fotodetector. O membro inclinado também serve para guiar luz refletida a partir das tiras de teste sobre o fotodetector. Os LEDs são montados sobre

uma superfície (49) feita de placa de circuito impresso.

A figura 5a ilustra uma vista do lado inferior do arranjo de defletor da forma de concretização exemplificada. Luz a partir dos LEDs, dos quais um (denotado por meio do número de referência 51) é mostrado, ilumina uma zona de uma tira de ensaio (não mostrada) através de uma abertura. Cada LED é associado a uma respectiva abertura. Na figura, uma abertura de exemplo é denotada por meio do número de referência 55. Luz é refletida a partir da tira sobre o fotodetector (52). Também mostrado é o membro inclinado (53) e divisor (56). LEDs adjacentes são blindados uns com respeito aos outros por meio de defletores (54).

A figura 5b mostra uma vista do lado inferior do arranjo de defletor da forma de concretização exemplificada a partir de uma diferente perspectiva. O membro inclinado (53) é simétrico em torno do eixo geométrico (57) e serve para guiar luz refletida luz de todos os quatro LEDs (não mostrados) para sobre o fotodetector (não mostrado).

A figura 6 mostra a vista superior do dispositivo de ensaio, observando-o por baixo sobre uma tira de teste (61) posicionada sobre as aberturas, (62) e mantida em posição por meio de pinos de posicionamento (63). Os LEDs e fotodetector podem ser parcialmente vistos através das aberturas.

Exemplo 1

O valor do sinal determinado a partir das respectivas zonas para um dispositivo de ensaio compreendendo uma zona de teste de baixa sensibilidade (para medir alta concentração de analito) e uma zona de teste de alta sensibilidade (para medir baixa concentração de analito) é determinado pelos meios de computação de sinal como segue:

O uso das tiras e janelas é definido na tabela abaixo (ver a figura 2)

Tira	Janela 1	Janela 2
A	Linha de teste de Baixa Sensibilidade (LS)	Linha de controle (Ctrl)
B	linha de teste de Alta Sensibilidade (HS)	Janela de referência (Ref)

Medições da luz refletida a partir de cada janela são feitas aproximadamente duas vezes em um segundo e um filtro digital de passa-baixa é usado para rejeitar ruído e suavizar ou alisar os dados. Valores filtrados são usados para detectar fluxo e determinar o resultado e são expressos em termos de atenuação relativa em percentagem normalizada (%A). Isto leva em conta e minimiza quaisquer variações nos componentes ópticos tanto dentro do dispositivo quanto entre os dispositivos.

O valor medido é inversamente proporcional à quantidade de luz refletida.

Para cada janela, a relação de janela nas janelas de referência, controle e teste é igual ao valor medido quando o suporte poroso está seco, $t = 0$ (antes da adição de amostra), dividido pelo valor medido no tempo t depois da adição da amostra:

Cálculo de relações de janela filtradas

Para cada ponto de tempo t , as relações de janela para cada janela são avaliadas como segue:

$$\begin{aligned} \text{Relação de ref}_t &= \frac{\text{valor de janela de referência filtrado}_{\text{tempo}=0}}{\text{valor de janela de referência filtrado}_{\text{tempo}=t}} \\ \text{Relação de HS}_t &= \frac{\text{valor de janela de teste LS filtrado}_{\text{tempo}=0}}{\text{valor de janela de teste filtrado}_{\text{tempo}=t}} \\ \text{Relação de LS}_t &= \frac{\text{valor de janela de referência filtrado}_{\text{tempo}=0}}{\text{valor de janela de referência filtrado}_{\text{tempo}=t}} \\ \text{Relação de Ctrl}_t &= \frac{\text{valor de janela de Ctrl filtrado}_{\text{tempo}=0}}{\text{valor de janela de Ctrl filtrado}_{\text{tempo}=t}} \end{aligned}$$

Cálculo de valores de %A filtrados

A atenuação relativa em percentagem normalizada (%A) é dada por meio da diferença da relação de janela de referência (ref.) e relação de janela sendo considerada (janelas de controle ou teste) dividida pela relação de janela de referência e multiplicada por 100%

para cada ponto de tempo t , valores de % A são calculados para a linha de teste HS, linha de teste LS e linha de controle, em que:

$$HS_t (\% A) = \frac{\text{Relação de ref}_t - \text{relação de teste de HS}}{\text{Relação de ref}_t} \times 100 \%$$

$$LS_t (\% A) = \frac{\text{Relação de ref}_t - \text{relação de teste de LS}}{\text{Relação de ref}_t} \times 100 \%$$

$$HS_t (\% A) = \frac{\text{Relação de ref}_t - \text{relação de teste de HS}}{\text{Relação de ref}_t} \times 100 \%$$

$$Ctrl_t (\% A) = \frac{\text{Relação de ref}_t - \text{relação de Ctrl}_t}{\text{Relação de ref}_t} \times 100 \%$$

Construção de Dispositivos de ensaio

Um dispositivo de ensaio de acordo com o primeiro aspecto da invenção foi construído compreendendo uma primeira tira de teste de ensaio compreendendo um reagente de ligação rotulado provido a montante de uma zona de detecção e uma segunda tira de teste de ensaio compreendendo um reagente de ligação rotulado e um segundo reagente de ligação (renovação) para o analito bem como reagente de ligação rotulado para uma zona de controle, provido a montante de uma zona de detecção e uma zona de controle.

Preparação do primeira tira de teste de ensaio

A zona de detecção foi preparada por meio de dispensa de uma linha de anticorpo anti- β -hCG (in-house clone 3468) em uma concentração de 3 mg/ml em tampão de PBSA, em uma taxa de 1 μ l/cm sobre fitas de nitrocelulose de dimensões de 350 mm de comprimento x 40 mm de largura (Whitman) tendo a tamanho de poro de 8 microns e a espessura entre 90-100 microns, que foram laminadas para formar uma camada de suporte de 175 micron. O anticorpo anti- β -hCG foi aplicado usando a plataforma de dispensa Biodot xyz3050 como uma linha de ~ 1,2 mm em largura e ~ 300 mm em comprimento em uma posição de 10 mm ao longo do comprimento da

nitrocelulose.

As fitas de nitrocelulose foram secadas usando o forno de secagem Hedinair série # 17494 ajustado em 55°C e velocidade 5 (único passe).

5 A nitrocelulose foi subseqüentemente bloqueada usando um tampão de bloqueio compreendendo uma mistura de 5% de etanol (BDH Analar 104766P) mais 150 mM de Cloreto de Sódio (BDH Analar 10241AP) mais 50 mM de base de trizma a partir de (Sigma TI 503) mais Tween 20 (Sigma P1379) e 1% (w/v) álcool polivinílico (PVA, Sigma 360627).

10 O tampão de bloqueio foi aplicado em uma taxa de 1,75 μ l/mm à extremidade proximal da fita. Uma vez quando a solução de bloqueio se impregnou na membrana, uma solução de 2% (w/v) de sacarose (Sigma S8501 em água desionizada) foi aplicada usando o mesmo aparelho em uma taxa de 1,6 μ l/mm e permitido que se impregnasse na membrana de
15 nitrocelulose por ~ 5 minutos).

As fitas de NC foram então secadas usando forno de secagem Hedinair série # 1 7494 ajustado em 75°C e velocidade de 5 (único passe).

Preparação do reagente de ligação rotulado mobilizável sobre o primeiro material de suporte poroso.

20 O reagente de ligação rotulado foi preparado de acordo com o seguinte protocolo:

Revestimento de partículas de látex com anti- α hCG.

1. Diluir azul partículas de látex azuis de Duke Scientific (400 nm em diâmetro, DB1040CB em 10 % de sólidos (w/v)) a 2% de sólidos
25 (w/v) com 100 mM de tampão de di-sódio tetra borato pH 8,5 (BDH AnalaR 102676G) (DTB).

2. Lavar o látex diluído por meio de centrifugação de um volume de (2 ml) de látex diluído em dois tubos centrífugos da Eppendorf em 17000 rpm (25,848 rcf) por 10 minutos em uma centrífuga 17RS da Heraeus

Biofuge. Remover e descartar o sobrenadante e re-suspender as pelotas em 100 mM de DTB para fornecer 4% de sólidos (w/v) em um volume total de 1 ml.

3. Preparar uma mistura de etanol e acetato de sódio (95 % de Etanol BDH AnalaR 104766P com 5 % w/v de Acetato de sódio Sigma S-2889).

4. Adicionar 100 µls de solução de etanol-acetato de sódio ao látex lavado na etapa 2 (isto é, 1 0% do volume de látex).

5. Diluir o anticorpo de estoque (in-house clone 3299) para fornecer ~ 1200 µg/ml de anticorpo em DTB.

6. Aquecer um volume de 1 ml do anticorpo diluído da etapa 5 em um banho de água ajustado em 41.5°C por ~ 2 minutos. Também aquecer o látex lavado mais etanol-acetato de sódio da etapa 4 no mesmo banho de água por 2 minutos.

7. Adicionar o anticorpo diluído ao látex mais etanol-acetato, misturar bem e incubar por 1 hora no banho de água ajustado em 41,5°C enquanto mistura usando um agitador magnético e um pulgão magnético colocado na mistura.

8. Preparar 40mg/ml de solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) (Intergen W22903 em água desionizada). Bloquear o látex por meio da adição de um igual volume de 40 mg/ml de BSA à mistura de látex/anticorpo/acetato de etanol e incubar no banho de água em 41,5°C por 30 minutos com agitação contínua.

9. Centrifugar a mistura em 17000 rpm por 10 minutos como na etapa 2, (separar o volume em lotes de 1 ml entre os tubos de Eppendorf). Remover e descartar o sobrenadante e re-suspender a pelota em 100 mM de DTB. Repetir a centrifugação como na etapa 2, remover e descartar o sobrenadante e re-suspender em pelota em Air Brushing Buffer (20% (w/v) de Sacarose Sigma S8501, 10% BSA (w/v) em 100 mM de Trizma Base Sigma

T1503 pH até 9). Adicionar Air Brushing Buffer para fornecer látex com 4% de sólidos (w/v).

O conjugado látex foi e borrifado em uma mistura de BSA e sacarose sobre um suporte poroso de fibra de vidro (F529-09, Whitman) em uma taxa de 5 g/hr e 110 mm/s e secado usando um Forno de Transportador de Hedinar, número de série 17494, ajustado em 65°C e velocidade de 5 (único passe).

A zona escolhida como a zona de referência estava a uma distância de 13 mm ao longo da nitrocelulose, mais precisamente a jusante da zona de detecção.

O material de fibra de vidro compreendendo o reagente de ligação rotulado foi fixado na membrana de nitrocelulose usando um claro filme laminado revestido com adesivo (Ferrisgate, 38 mm de largura) arranjado de modo que o reagente rotulado estava na parte mais superior e a fibra de vidro sobrepôs a superfície da nitrocelulose por ~ 2mm ao longo do comprimento (350 mm) da fita de membrana de nitrocelulose. A fibra de vidro foi fixada à extremidade da nitrocelulose de modo que ela estava a montante da zona de detecção.

A folha laminada foi subsequenteemente cortada em tiras de teste compreendendo um material de suporte poroso de fibra de vidro tendo uma largura de 6 mm e um comprimento 25 mm, com o reagente rotulados tendo sido aplicado em 20 mm ao longo do comprimento da fibra de vidro, provido a montante de e sobrepondo por 2mm, uma membrana de nitrocelulose tendo uma largura de 6 mm e um comprimento de 40 mm.

Preparação da segunda tira de teste de ensaio.

A zona de detecção foi preparada como segue:

anticorpo de β -hCG anti-humano de rato Mab (clone 3468) 3mg/ml em tampão de PBSA foi plotado em 1 μ l/cm sobre nitrocelulose (do tipo e dimensões como aquelas de acordo com o primeiro ensaio) na posição

de 10 mm usando uma plataforma de dispensa Biodot XYZ3050 para prover uma única zona de detecção para o primeiro ensaio.

A zona de controle foi preparada como segue:

anticorpo de Cabra-anti-Coelho (Lampire) em 2 mg/ml em tampão de PBSA foi plotado em 1 μ l/cm sobre a mesma nitrocelulose que a usada para o segundo ensaio, na posição de 13 mm usando uma 13MM posição usando uma plataforma de dispensa Biodot XYZ3050 para prover uma única zona de controle para o dispositivo de ensaio.

α -hCG de rato-anti-humano mAb (clone 3299) conjugado a 400 nm de látex de poliestireno azul (Duke Scientific) foi misturado com anticorpo de renovação mAB de β -hCG anti-humano de rato (in-house clone 3468) em 3 mg/ml para fornecer um látex azul de % final de 3 %, uma concentração final 3468 de 0,075 mg/ml e concentração de 0,06 mg/ml do anticorpo livre de anti- β -hCG. A mistura resultante foi pincelada a ar sobre fibra de vidro de Whatman (carretéis de largura de 2 mm) usando o BIODOT XYZS (número de série 1673) em 90 g/hr pulverizado a 2,02 μ g/cm sobre fibra de vidro F529-09 em aproximadamente a posição de 20 mm. A solução pulverizada se espalhou para formar uma fita que tinha aproximadamente 7 mm em comprimento.

Reagente de ligação rotulado para a zona de controle foi também depositado sobre a mesma região do suporte poroso que o reagente de ligação rotulado para o analito como segue:

IgG de coelho (Dako) foi conjugado com 400 nm de látex de poliestireno de látex azul (Duke Scientific) em BSA/sacarose para fornecer uma % final de látex azul de 0,7% de sólidos e borrifado a 65 g/hr sobre fibra de vidro.

A fibra de vidro foi secada usando um Forno de Transportador Hedinar número de série 17494 ajustado em 65°C e velocidade de 5 (único passe). Um segundo passe de látex foi depositado sobre a fibra de vidro por

meio de repetição do acima, todavia, em uma deslocamento de $\sim 0,8$ mm a partir da posição original de pulverização (mais a jusante da fibra de vidro). A fibra de vidro como secada como descrito acima.

O material de fibra de vidro com látex pulverizado foi fixada à
5 membrana de nitrocelulose usando um claro filme laminado revestido com adesivo (Ferris gate, 38 mm de largura) arranjado de modo que o látex pulverizado estava mais acima e a fibra de vidro sobrepôs a superfície da nitrocelulose por 2 mm ao longo do comprimento (350 mm) da fita de membrana de nitrocelulose. A fibra de vidro foi provida a montante da
10 membrana de nitrocelulose e os reagentes de ligação foram providos em direção à extremidade distal da fibra de vidro.

A folha laminada foi subsequenteemente cortada em tiras de teste compreendendo um material de suporte poroso de fibra de vidro tendo uma largura de 6 mm e um comprimento 25 mm, com os reagentes rotulados
15 tendo sido aplicados a 20 mm ao longo do comprimento da fibra de vidro, providos a montante de e sobrepondo por 2 mm, uma membrana de nitrocelulose tendo uma largura de 6 mm e um comprimento de 40 mm. Um receptor de amostra poroso (Filtrona) de 45 mm de comprimento, 12 mm de largura e uma espessura de aproximadamente 2,5 mm foi provido a montante
20 de e sobrepondo o primeiro material de suporte poroso por aproximadamente 3 mm.

Reagente de ligação rotulado para a zona de controle foi também depositado sobre a mesma região do suporte poroso que o reagente de ligação rotulado para o analito como segue:

25 IgG de coelho (Dako) foi conjugado com 400 nm de látex de poliestireno de látex azul (Duke Scientific) em BSA/sacarose para fornecer uma % final de látex azul de 0,7% de sólidos e pulverizado a 65 g/hr sobre fibra de vidro (F529-09).

A primeira e segunda tiras de teste de ensaio foram

depositadas em paralelo uma em relação à outra e uma almofada de aplicação de amostra de poliéster em comum (505521, Filtrona) foi colocada acima nas extremidades a montante de ambos os ensaios. Uma almofada de poço de absorvente de algodão em comum (CF7, Whitman) foi colocada por cima a jusante das zonas de referência e controle.

O dispositivo de ensaio foi preparado por meio da montagem das tiras de ensaio em uma configuração paralela em uma caixa de plástico compreendendo os componentes ópticos. Os LEDs foram arranjados de modo que os quatro LEDs foram posicionados em estreita proximidade às respectivas quatro zonas (2 zonas de detecção e as zonas de referência e controle) em uma posição deslocada e acima do plano do ensaios. Um único fotodetector foi posicionado entre e acima do plano dos dois ensaios e posicionado no centro das tiras de ensaio (ver a figura 2).

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de ensaio combinado com um dispositivo de leitura de resultado para ler o resultado dos ensaios realizados no dispositivo de ensaio, o dispositivo de ensaio (20) sendo para determinar a presença e/ou
5 extensão de um ou mais analitos em uma amostra de líquido, o dito dispositivo de ensaio caracterizado pelo fato de que compreende:

a) primeira e segunda tiras de ensaio (22, 23), cada compreendendo um trajeto de fluxo respectivo tendo uma zona de detecção (24, 26) para imobilizar um reagente de ligação rotulado, em que detecção de
10 um reagente de ligação rotulado em uma ou ambas as zonas de detecção é indicativa da presença e/ou extensão de um ou mais analitos, em que a primeira e segunda tiras de teste estão sobre substratos separados ou são providas em um substrato comum, mas isoladas de tal forma que o líquido não pode cruzar do trajeto de fluxo de uma tira de teste para o trajeto de fluxo
15 da outra, e

em que a primeira e a segunda tiras de teste tem um região de aplicação de amostra porosa comum (21)

b) uma zona de referência compartilhada (27) presente em uma das ditas primeira e segunda tiras de teste;

20 o dispositivo de leitura de resultado de ensaio, compreendendo:

c) uma ou mais fontes de luz (41, 45) para iluminar as zonas de detecção e a zona de referência compartilhada;

d) um ou mais fotodetectores (4) para detectar luz a partir das
25 zonas de detecção e da zona de referência compartilhada, fotodetector/es este/s que geram um sinal cuja magnitude do sinal é relacionada com a quantidade de luz detectada; e

e) meios de processamento de sinal para processar sinais do/s fotodetector/es,

em que os meios de processamento de sinal são adaptados e configurados para medir o sinal da zona de referência compartilhada em uma das ditas tiras de teste para prover um valor compensado para o sinal obtido na zona de detecção da outra das ditas tiras de teste.

5 2. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira e/ou segunda tira de teste compreendem um reagente de ligação rotulado para um analito ou análogo de analito provido em uma forma mobilizável a montante da zona de detecção em um estado seco antes do uso do dispositivo.

10 3. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a primeira e/ou segunda tiras de ensaio compreendem um reagente de ligação para um analito ou um reagente de ligação rotulado provido em uma forma imobilizada na zona de detecção.

15 4. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende uma zona de controle compartilhada (25).

5. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a zona de controle é composta como parte ou da primeira ou da segunda tiras de ensaio.

20 6. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a zona de controle é composta como parte de uma tira de teste e a zona de referência compartilhada é composta como parte da outra tira de teste.

25 7. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a primeira tira de teste e a segunda tira de teste são capazes de detectar a presença de um analito em diferentes faixas de concentração.

8. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os trajetos de fluxo

das primeira e segunda tiras de teste, cada, compreendem um suporte poroso (42,46).

5 9. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o(s) suporte(s) poroso(s) compreende(m) nitrocelulose.

10 10. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende um poço provido na extremidade distal das tiras de teste.

11. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a primeira e segunda tiras de teste, cada, compreende diferentes quantidades de reagente de ligação rotulado.

12. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a primeira tira de teste é para a detecção de um analito em uma faixa inferior e a segunda tira de teste é para a detecção de analito em uma faixa mais alta.

13. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o segundo ensaio tem uma maior quantidade de reagente de ligação rotulado que a primeira tira de teste.

20 14. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o primeiro ensaio compreende um reagente de ligação rotulado para o analito provido a montante de uma zona de detecção e o segundo ensaio compreende um reagente de ligação rotulado para o analito e um segundo reagente de ligação para o analito provido a montante da zona de detecção.

25 15. Dispositivo de ensaio de acordo com as reivindicações 13 e 14, caracterizado pelo fato de que o primeiro ensaio compreende uma zona de referência compartilhada e o segundo ensaio compreende uma zona de controle compartilhada.

16. Dispositivo de ensaio de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a zona de referência é provida a jusante da zona de detecção.

5 17. Dispositivo de ensaio de acordo com as reivindicações 15 e 16, caracterizado pelo fato de que a zona de controle é provida a jusante da zona de detecção.

18. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um fotodetector detecta luz de uma pluralidade de zonas.

10 19. Dispositivo de ensaio de acordo com as reivindicações 4 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende um único fotodetector para detectar luz a partir das duas zonas de detecção, da zona de referência e de uma zona de controle.

15 20. Dispositivo de ensaio de acordo com as reivindicações 4-19, caracterizado pelo fato de que compreende quatro fontes de luz para iluminar as duas zonas de detecção, a zona de referência e uma zona de controle.

20 21. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a quantidade de luz detectada pelo(s) fotodetector(es) a partir das zonas de detecção e da zona de referência é medida antes da adição de amostra no dispositivo de ensaio e novamente depois da adição de amostra no dispositivo de ensaio, e uma relação entre as duas medições, antes e após a adição da amostra, calculada para cada zona.

25 22. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as fontes de luz compreendem um ou mais LEDS.

23. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o analito a ser

determinado é gonadotropina coriônica humana.

24. Dispositivo de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a amostra de líquido é urina.

5

25. Método de realização de um ensaio para determinar a presença e/ou extensão de um analito em uma amostra de líquido, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de contatar a amostra com a região de aplicação de amostra comum de um dispositivo de ensaio combinado e dispositivo de leitura, conforme definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

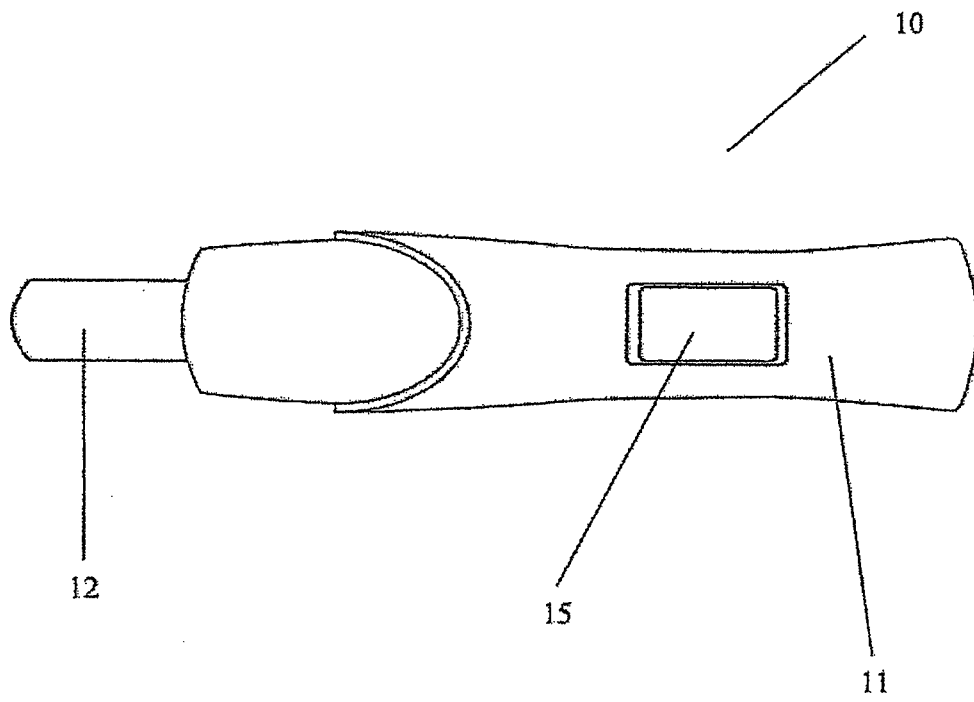
Figura 1

Figura 2

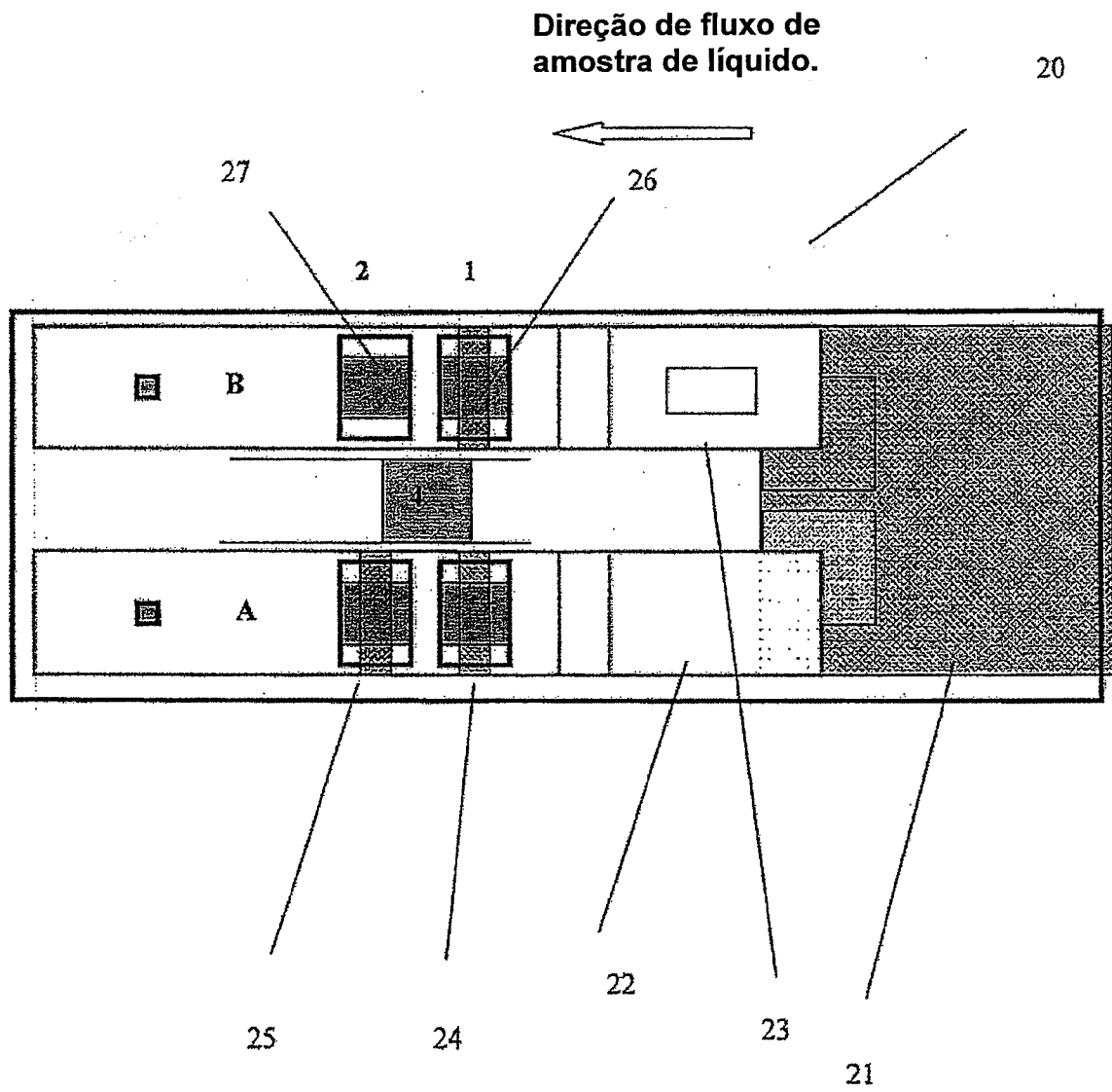
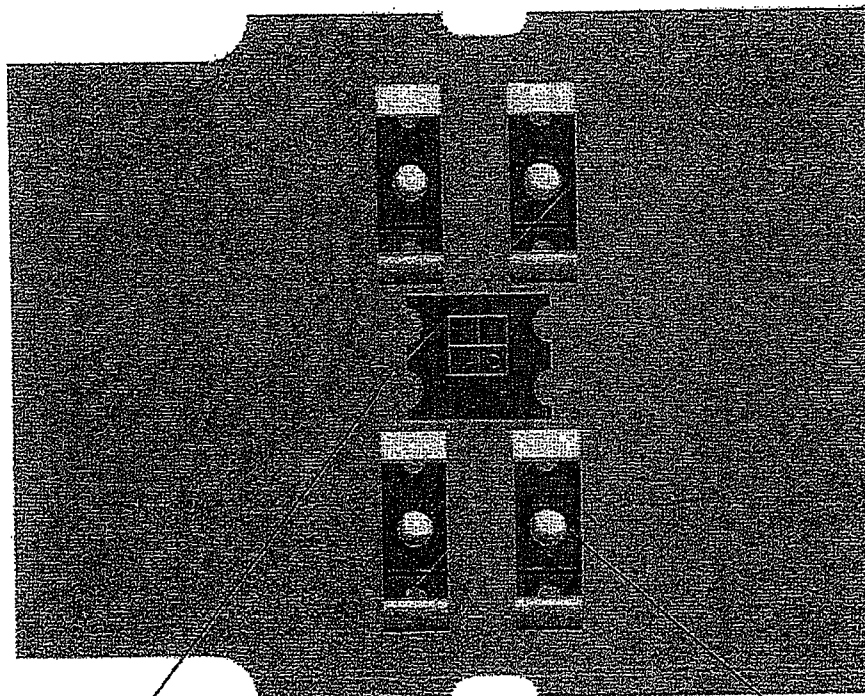


Figura 3

32

31

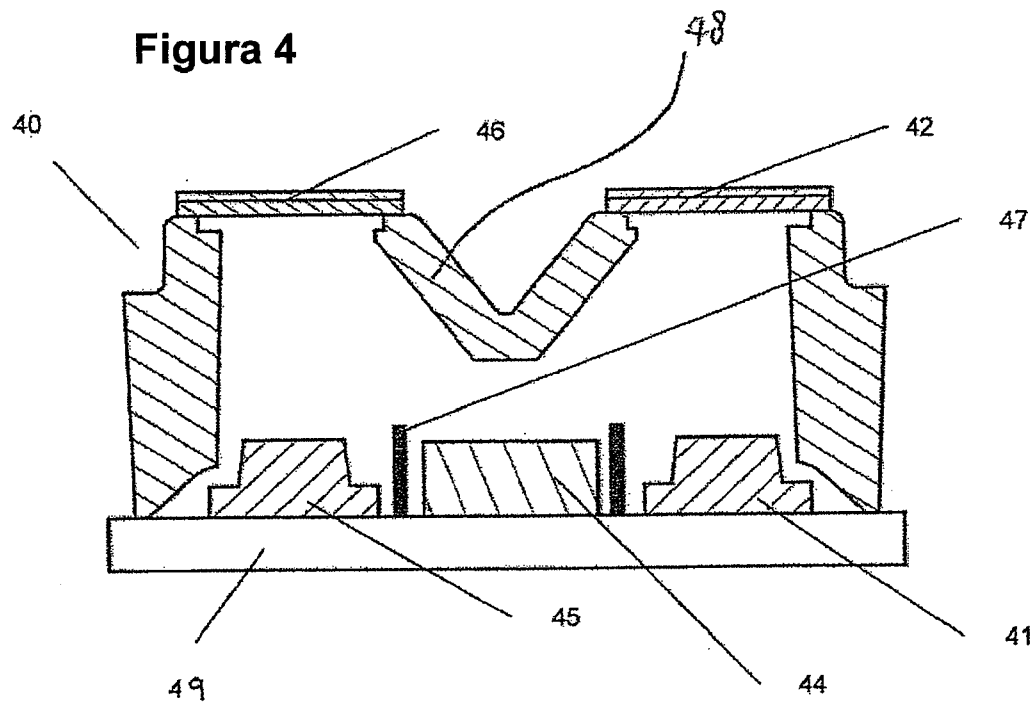
Figura 4

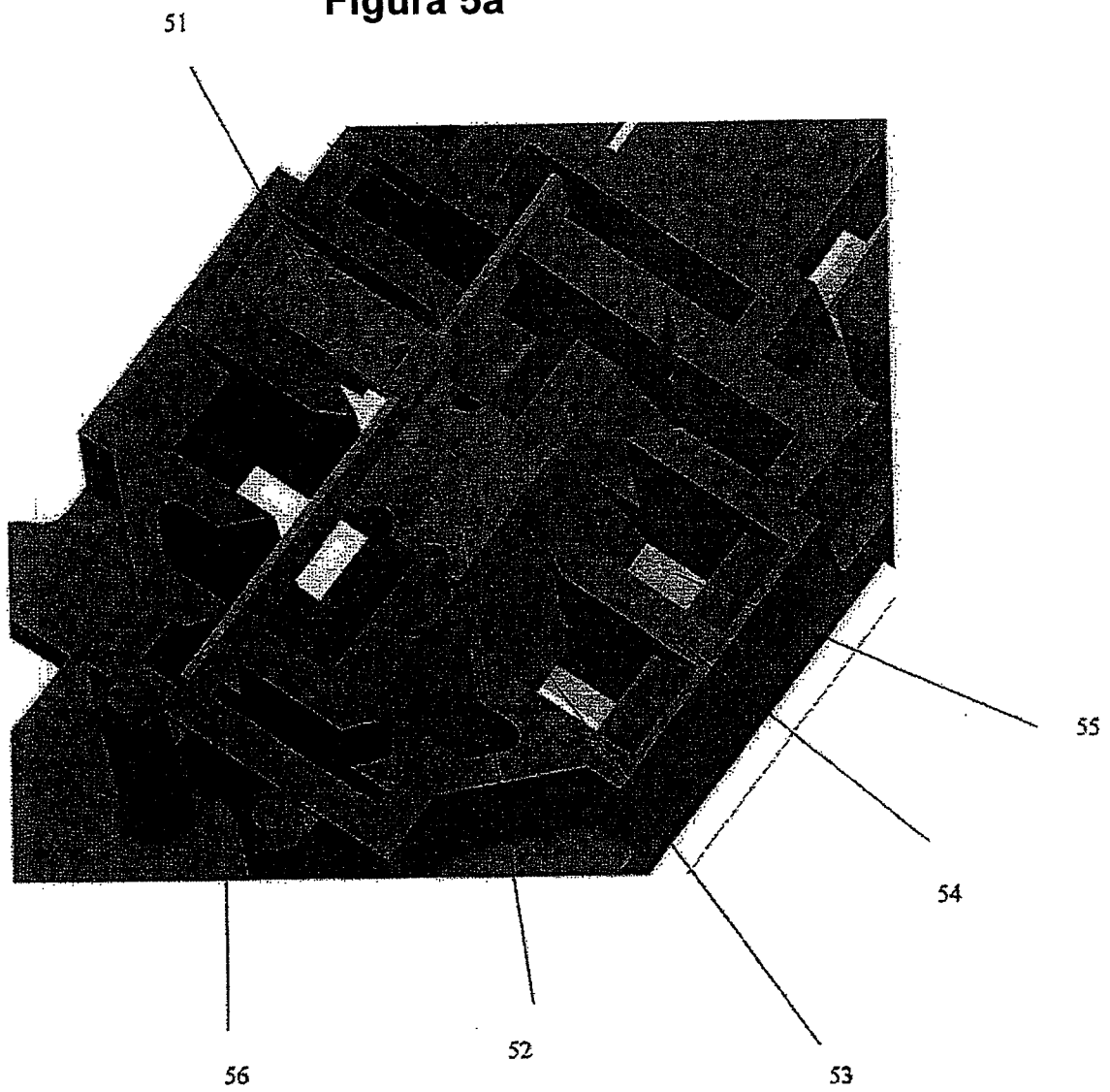
Figura 5a

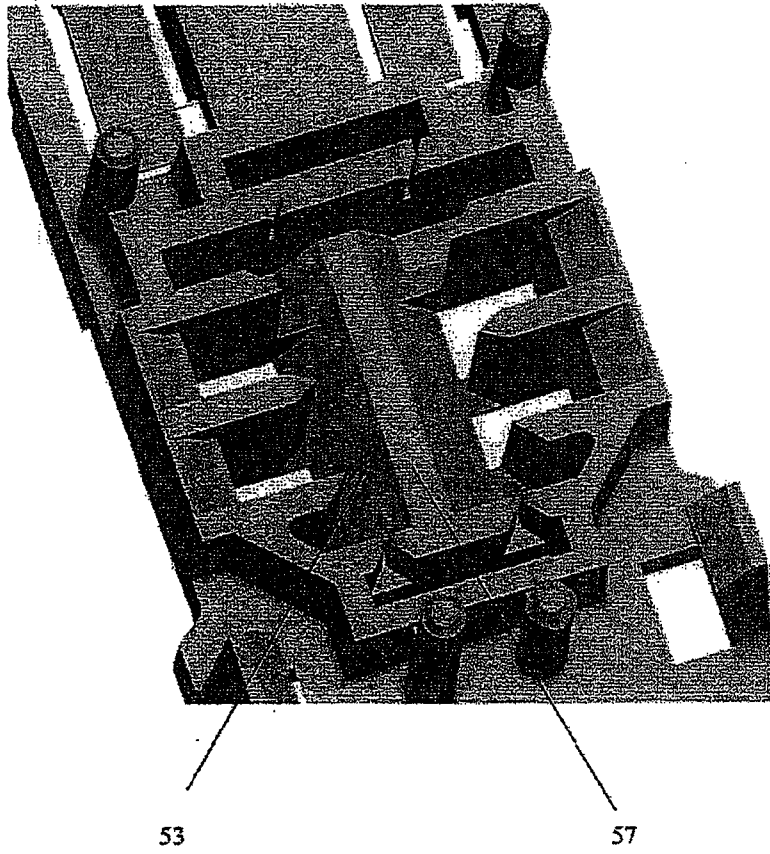
Figura 5b

Figura 6