



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

(21) **PI 0713028-7 A2**

(22) Data de Depósito: 20/06/2007
(43) Data da Publicação: 16/10/2012
(RPI 2180)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/558
B01L 3/00

(54) **Título:** DISPOSITIVO DE ENSAIO E MÉTODO

(30) **Prioridade Unionista:** 20/06/2006 SE 0601354-4

(73) **Titular(es):** Amic AB

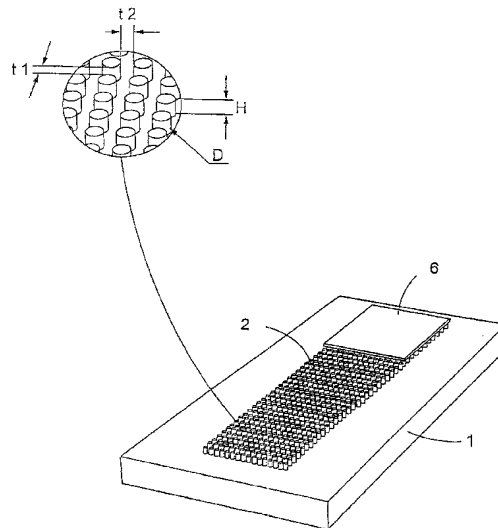
(72) **Inventor(es):** Mendel-Hartvig, Ib, Öhman, Per Ove

(74) **Procurador(es):** Magnus Aspeby e Claudio Szabas

(86) **Pedido Internacional:** PCT SE2007050444 de
20/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/149042de
27/12/2007

(57) **Resumo:** DISPOSITIVO DE ENSAIO E MÉTODO. É proporcionado um dispositivo de ensaio que compreende uma tampa e uma base, dita base compreendendo, uma zona de adição de amostra, uma zona de reação e uma zona de absorção, ditos componentes estando em conexão de fluidos e sendo parte de uma passagem de fluidos levando desde a zona de adição de amostra até a zona de absorção, em que: (a) um poço de adição de amostra está integrado na tampa, (b) a zona de absorção consiste em uma área sobre um substrato não poroso, tendo projeções substancialmente perpendiculares, ditas projeções definindo um volume, que juntamente com o volume da passagem de fluidos define o volume de amostra submetido ao ensaio, e (c) pelo menos um filtro está entre o poço de adição de amostra e a zona de adição de amostra. Ademais, é proporcionado métodos para manusear amostras.



Dispositivo de ensaio e método

A presente invenção se refere a um dispositivo de ensaio com funções integradas que melhora o dispositivo.

5

Antecedentes da invenção

Muitos testes bioquímicos anteriormente realizados no laboratório usando equipamentos avançados e técnicos especializados podem hoje ser realizados por um clínico, uma enfermeira ou mesmo o(a) próprio(a) paciente, usando dispositivos pequenos e muitas vezes descartáveis. Isto é um resultado de um melhor entendimento da bioquímica e da medicina, bem como a progressiva miniaturização tanto da mecânica como da eletrônica, que vem ocorrendo nas últimas décadas.

15

Tais testes podem ser divididos em dois grupos: "testes de uma etapa" onde a reação ocorre em um substrato após a adição de amostra, e o resultado é detectado como uma mudança de uma ou mais propriedades de dito substrato; e "testes de duas etapas", onde a amostra é seguida pela adição de um conjugado de detecção, levando a uma reação específica que resulta em um sinal detectável.

20

Na maioria dos ensaios, um conjugado de detecção e possivelmente outros reagentes são pré-dispensados ou integrados no dispositivo, pondo de lado a necessidade de uma adição separada de reagentes pelo usuário.

25

O tipo mais comum de dispositivos de ensaio descartáveis consiste em uma zona ou área para receber a amostra, uma zona de reação, e opcionalmente uma zona de transporte ou de incubação conectando a zona de recepção e de reação, respectivamente. Esses dispositivos de ensaio

30

são conhecidos como dispositivos de ensaio de imunocromatografia ou simplesmente referidos como testes de tiras. Eles empregam um material poroso, tal como nitrocelulose, definindo uma passagem de fluidos capaz de suportar o fluxo capilar. A zona de recepção de amostra freqüentemente consiste em um material mais poroso, capaz de absorver a amostra, e, quando a separação de células sanguíneas é desejada, eficaz para prender as células sanguíneas vermelhas. Exemplos de tais materiais são materiais fibrosos, tais como papel, tosa, gel ou tecido, compreendido, por exemplo, de celulose, nitrocelulose, lã, fibra de vidro, asbestos, fibras sintéticas, polímeros, etc. ou misturas dos mesmos. A zona de transporte ou de incubação normalmente consiste nos mesmos materiais ou similares, freqüentemente com porosidade diferente que essa da zona de recepção de amostra. Similarmente, a zona de reação, que pode estar integrada com a zona de incubação, ou constituindo a maior parte distal da mesma, normalmente consiste em materiais fibrosos absorventes similares, tais como nitrocelulose, ou quaisquer dos materiais listados acima.

Materiais de nitrocelulose também são freqüentemente usados como a matriz que constitui a zona de transporte ou de reação, ou que conecta a zona de recepção e a zona de reação. Uma desvantagem significativa com a nitrocelulose é sua alta ligação não específica de proteínas e outras biomoléculas. As tiras de teste atuais, contudo freqüentemente lidam com um excesso de amostra, reduzindo a influência dessa ligação. Outra desvantagem da nitrocelulose são suas variações em relação tanto a qualidade química como física. É de qualquer modo desejável

minimizar o volume de amostra, em linha com a tendência a miniaturizar o teste inteiro, incluindo minimizar as quantidades de reagentes, sem comprometer a acurácia e confiabilidade.

5 Em um dispositivo de ensaio ou teste de tiras, o(s) material(is) poroso(s) é/são montado(s) em um carreador, tal como uma tira de material termoplástico, papel, papelão ou similares. Ademais, uma cobertura pode ser proporcionada, dita cobertura tendo pelo menos uma abertura
10 para receber a amostra, e uma abertura ou uma área transparente para ler o resultado do ensaio. Frequentemente esta cobertura é simultaneamente um alojamento ou estojo, encerrando o material poroso, proporcionando estabilidade e proteção estrutural. Exemplos de tais construções incluem
15 pedido de patente publicado US número de série 10/794,516, publicado como 2004171174, publicação internacional número WO2004/038414, ou patente US número de série 6,846,453.

 O documento US 6.312.888 revela um dispositivo de ensaio que compreende diversas camadas para a análise de um
20 analito em uma amostra biológica.

 Do documento WO2005/089082 se conhece um dispositivo para manusear amostras líquidas, compreendendo uma área que tem projeções substancialmente verticais a sua superfície, por meio da qual as projeções criam uma força capilar. Em
25 tais dispositivos de ensaio surgem novos problemas comparados com dispositivos de ensaio anteriores sem projeções criando uma força capilar.

 Os problemas do estado da técnica em relação a dispositivos de ensaio incluem como melhorar a adição de
30 amostra, como melhorar a tolerância do hematócrito para amostras de sangue, e como proteger o dispositivo de ensaio

dos danos de uma pipeta, quando uma pipeta é usada para adicionar um líquido a dito dispositivo de ensaio.

Sumário da invenção

5 Um objeto da presente é dirigido às desvantagens associadas com dispositivos de ensaio conhecidos, e proporcionar um dispositivo de ensaio melhorado, aliviando pelo menos alguns dos problemas na técnica anterior. Adicionalmente desvantagens associadas com dispositivos
10 conhecidos e as vantagens associadas com as modalidades da invenção serão aparentes aos técnicos no assunto mediante um estudo mais atento da descrição, exemplos e reivindicações.

A presente invenção torna disponível um dispositivo de
15 ensaio como definido nas reivindicações, incorporado no presente documento por referência.

Aspectos adicionais da invenção, bem como suas vantagens, serão evidentes aos técnicos no assunto mediante um estudo mais atento da descrição, exemplos,
20 reivindicações e desenhos.

Descrição dos desenhos

A invenção será descrita em detalhes na seguinte descrição, exemplos não limitativos, e reivindicações, com
25 referência aos desenhos anexos, em que

A figura 1 mostra uma vista explodida de uma modalidade da invenção,

a figura 2 mostra uma vista lateral de uma modalidade da invenção,

30 e a figura 3 mostra esquematicamente uma modalidade tendo uma passagem de fluidos, e um detalhe de dita

passagem de fluidos, ilustrando as dimensões das projeções substancialmente perpendiculares.

A figura 4 mostra uma modalidade tendo uma tampa, um filtro, uma base e um fundo.

5

Descrição

Os ensaios podem ser classificados em dois grupos, baseando-se nos critérios que mais influenciam no desempenho que pode ser esperado de um ensaio em relação à precisão e a sensibilidade:

10

- ensaios competitivos, isto é, ensaios usando uma quantidade limitada de anticorpo, e

15

- ensaios tipo sanduíche em fase sólida, usando uma quantidade em excesso de anticorpo, também chamados ensaios imunométricos.

20

Na forma de ensaio competitivo, a quantidade de anticorpo é insuficiente para se ligar a todos os antígenos. Uma quantidade fixa de antígeno marcado compete com o antígeno não marcado da amostra para a quantidade limitada de sítios de ligação de anticorpos. A concentração de antígeno na amostra pode ser determinada a partir da proporção de antígeno marcado que está ligado ao anticorpo ou alternativamente que está livre.

25

Na forma de ensaio tipo sanduíche, o antígeno presente na amostra se liga ao excesso de anticorpos na fase sólida. O antígeno ligado é então detectado com um segundo anticorpo marcado. Neste exemplo, a quantidade de anticorpo marcado capturado na fase sólida é diretamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra.

30

Em ambos estes desenhos básicos de imunoensaios, e as variantes dos mesmos, existe uma grande necessidade por uma

padronização e controle do ensaio e do ambiente em que se está fazendo o ensaio. As modalidades da presente invenção são dirigidas a alguns problemas relacionados com imunoensaio de fluxo lateral em fase sólida. Uma das etapas cruciais é a solubilização e transporte de um conjugado de 5 detecção. Outra etapa importante é a separação de células sanguíneas vermelhas onde existe um alto risco de lise celular e coagulação sanguínea.

A invenção não está restrita à forma de ensaio 10 descrita acima, podendo ser também adaptada a outras formas de ensaio bem conhecidas pelos técnicos no assunto.

Antes dos presentes dispositivo e método serem descritos, é para ser entendido que esta invenção não está limitada às configurações, etapas do método, e materiais 15 particulares descritos no presente documento uma vez que tais configurações, etapas e materiais podem variar de algum modo. É para ser entendido também que a terminologia empregada no presente documento é usada com o propósito de descrever modalidades particulares somente e não tem a 20 intenção de ser limitante uma vez que a presente invenção será limitada somente pelas reivindicações apensas e seus equivalentes.

Deve-se notar também que, tal como usado neste relatório descritivo e as reivindicações apensas, as formas 25 singulares "um", "uma" e "a/o" incluem os respectivos plurais a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a uma mistura de reação contendo "um anticorpo monoclonal" inclui uma mistura de dois ou mais anticorpos.

30 O termo "aproximadamente" quando usado no contexto de valores numéricos denota um intervalo de acurácia, familiar

e aceitável a um técnico no assunto. Dito intervalo pode ser de $\pm 10 \%$ ou preferivelmente de $\pm 5 \%$.

5 Ao descrever e reivindicar a presente invenção, a seguinte terminologia será usada de acordo com as definições estabelecidas no presente documento.

10 O termo "amostra" no presente documento significa um volume de um líquido, solução ou suspensão, que se pretende que seja submetido a uma determinação qualitativa ou quantitativa de quaisquer de suas propriedades, tais como a presença ou ausência de um componente, a concentração de um componente, etc. A amostra pode ser uma amostra colhida de um organismo, tal como um mamífero, preferivelmente um ser humano; ou da biosfera, tal como uma amostra de água, ou um efluente; ou oriunda de um processo técnico, químico ou 15 biológico, tal como um processo de manufatura, por exemplo, a produção de medicamentos, alimentos, rações, ou a purificação de água potável ou o tratamento de efluentes de resíduos. A amostra pode ser submetida a uma determinação qualitativa ou quantitativa como tal, ou após um pré- 20 tratamento adequado, tal como homogeneização, sonicação, filtração, sedimentação, centrifugação, tratamento térmico, etc.

25 As amostras típicas no contexto da presente invenção são fluidos corporais tais como sangue, plasma, soro, linfa, urina, saliva, sêmen, líquido amniótico, suco gástrico, fleuma, escarro, muco, lágrimas etc.; fluidos ambientais tais como água superficial, água subterrânea, lama etc.; e fluidos de processo tais como leite, soro do leite, caldo, soluções de nutrientes, meio de cultura de 30 células, etc. As modalidades da presente invenção são aplicáveis a todas as amostras, mas preferivelmente a

amostras de fluidos corporais, e mais preferivelmente a amostras de sangue total.

A determinação baseada no fluxo lateral de uma amostra e a interação de componentes presentes na amostra com os reagentes presentes no dispositivo e a detecção de tal interação, ou qualitativamente ou quantitativamente, pode ser para quaisquer fins, tais como para fins diagnósticos, ambientais, de controle de qualidade, regulatórios, forenses ou de pesquisa. Tais testes são frequentemente referidos como ensaios de cromatografia, ou ensaios de fluxo lateral, como ensaios imunocromatográficos, por exemplo.

Exemplos de determinações de diagnóstico incluem, mas não estão limitados a, determinação de analitos, também chamados marcadores, específicos para diferentes transtornos, por exemplo, transtornos metabólicos crônicos, tais como glicose no sangue, cetonas no sangue, glicose na urina (diabetes), colesterol no sangue (aterosclerose, obesidade, etc.); marcadores de outras doenças específicas, por exemplo, doenças agudas, tais como marcadores de infarto coronário (por exemplo, troponina-T), marcadores de função da tireóide (por exemplo, determinação de hormônio estimulante da tireóide (TSH)), marcadores de infecções virais (o uso de imunoenaios de fluxo lateral para a detecção de anticorpos virais específicos); etc.

Outro importante campo de determinações de diagnóstico se refere a gravidez e fertilidade, por exemplo, testes de gravidez (determinação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) i.a.), testes de ovulação (determinação de hormônio luteinizante (LH) i.a.), testes de fertilidade

(determinação de hormônio folículo estimulante (FSH) i.a.)
etc.

Outro campo ainda importante é esse de testes de
drogas, para fácil e rápida detecção de drogas e
5 metabólitos de drogas indicando abuso de drogas; tal como a
determinação de drogas e metabólitos de drogas específicos
(por exemplo, THC) em amostras de urina, etc.

O termo "analito" é usado como um sinônimo do termo
"marcador" e se pretende que englobe qualquer substância
10 que é medida quantitativamente ou qualitativamente.

Os termos "zona", "área" e "sítio" são usados no
contexto desta descrição, exemplos e reivindicações para
definir partes da passagem de fluidos sobre um substrato,
ou em dispositivos da técnica anterior ou em um dispositivo
15 de acordo com uma modalidade da invenção.

O termo "reação" é usado para definir qualquer reação,
que ocorre entre componentes de uma amostra e pelo menos um
reagente ou reagentes sobre ou em dito substrato, ou entre
dois ou mais componentes presentes em dita amostra. O termo
20 "reação" é particularmente usado para definir a reação, que
ocorre entre um analito e um reagente como parte da
determinação qualitativa ou quantitativa de dito analito.

O termo "base" no presente documento significa o
carreador ou a matriz a qual uma amostra é adicionada, e
25 sobre a ou na qual a determinação é realizada, ou onde a
reação entre analito e reagente ocorre.

O termo "funcionalidade química" compreende qualquer
composto químico ou fração necessária para conduzir ou
facilitar o ensaio. Um grupo de compostos químicos, com
30 particular relevância na presente invenção, são compostos
ou componentes que exibem afinidade para, ou capacidade de

ligação ou interação com, um ou mais componentes na amostra. Agentes de separação de células sanguíneas vermelhas constituem um exemplo ilustrativo. Tais agentes podem ser qualquer substância capaz de agregar ou ligar as
5 células sanguíneas vermelhas.

O termo "funcionalidade biológica" compreende todas as interações biológicas entre um componente em uma amostra e um reagente sobre ou no substrato, tais como catálise, ligação, internalização, ativação, ou outra interação
10 bioespecífica. Reagentes adequados incluem, mas não são limitados a, anticorpos, fragmentos de anticorpos e derivados, anticorpos de cadeia simples, lectinas, DNA, aptâmeros, etc., incluindo outros polímeros ou moléculas com capacidade de ligação. Tais reagentes podem ser
15 identificados por um técnico no assunto, seguindo a escolha do componente a ser separado, usando experimentos padrão, por exemplo, métodos de seleção e bibliotecas químicas.

O termo "funcionalidade física" no presente documento compreende funcionalidades envolvidas em reações e
20 interações outras que aquelas que são principalmente químicas ou biológicas. Exemplos incluem diâmetro, altura, forma, seção transversal, topografia de superfície e padrões de superfície, o número de projeções por unidade de área, comportamento de umedecimento da superfície de ditas
25 projeções, ou uma combinação das mesmas, e/ou outras funcionalidades que influenciam o fluxo, retenção, adesão ou rejeição de componentes da amostra. As distinções entre interações químicas, biológicas e físicas não são sempre claras, e é possível que uma interação - tal como uma
30 interação entre um componente em uma amostra e um reagente

sobre o substrato - envolva zonas químicas, biológicas bem como físicas.

Os termos "hidrofílico" e "hidrofóbico", como em compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos, interações
5 hidrofílicas ou hidrofóbicas etc. têm o significado geralmente entendido por um técnico no assunto, e correspondentes àqueles usados livros texto geralmente reconhecidos.

A presente invenção proporciona um dispositivo de
10 ensaio que compreende uma tampa e uma base, dita base compreendendo uma zona de adição de amostra, uma zona de reação e uma zona de absorção, ditos componentes estando em conexão de fluidos e sendo parte de uma passagem de fluidos levando desde a zona de adição de amostra até a zona de
15 absorção, em que (a) um poço de adição de amostra está integrado na tampa (b) a zona de absorção consiste em uma área sobre um substrato não poroso, tendo projeções substancialmente perpendiculares, ditas projeções definindo um volume que juntamente com o volume da passagem de
20 fluidos define o volume de amostra submetido ao ensaio, e (c) pelo menos um filtro está entre o poço de adição de amostra e a zona de adição de amostra.

As modalidades da presente invenção estão direcionadas a dispositivos que incluem pelo menos uma passagem de fluidos
25 para o transporte de fluidos, tendo uma primeira extremidade e uma segunda extremidade; e uma zona de absorção especificamente adaptada para estabelecer, manter e/ou medir o transporte de fluidos através ou ao longo de dita pelo menos uma passagem de fluidos, em que dita zona
30 de absorção compreende um substrato não poroso tendo uma superfície de substrato, dita zona tendo projeções

substancialmente perpendiculares a dita superfície, e ditas projeções tendo uma altura (H), diâmetro (D) e uma distância ou distâncias entre as projeções (t_1 , t_2) de tal modo que o fluxo capilar lateral de dito fluido em dita zona seja alcançado.

Outras modalidades se referem a métodos para manusear o transporte de fluidos em ou ao longo de pelo menos uma passagem de fluidos sobre ou em um substrato, em que o transporte de fluidos em dita passagem é estabelecido e/ou mantido e/ou medido por uma zona de absorção, arranjada no fluido em contato com dita passagem, e dita zona de absorção compreendendo uma zona feita de um substrato não poroso, dita zona tendo projeções substancialmente perpendiculares a dita superfície, e ditas projeções tendo uma altura (H), diâmetro (D) e uma distância ou distâncias entre as projeções (t_1 , t_2) de tal modo que o fluxo capilar lateral de dito fluido sobre dita zona seja alcançado.

Em um dispositivo de acordo com a invenção, a capacidade do dispositivo é exatamente determinada pelo volume definido pela zona de absorção. Quando a amostra é adicionada em excesso, o volume submetido ao ensaio será sempre idêntico, devido à estrutura não porosa bem definida e reproduzível. A taxa de fluxo por sua vez pode ser influenciada e controlada por uma seleção apropriada das dimensões das projeções substancialmente verticais, seu diâmetro, altura e distâncias entre as projeções, bem como por ajuste de suas propriedades químicas, biológicas ou físicas, por exemplo, por revestimento das projeções com um composto adequado. De acordo com uma modalidade, as projeções são tornadas hidrofílicas por meio da adição de dextrana. A taxa de fluxo pode também ser em seguida

ajustada por seleção de um grau adequado de hidrofiliicidade da lâmina, ou essa de um adesivo usado para anexar a lâmina às projeções.

5 O presente dispositivo de ensaio compreende um poço de
adição de amostra. O poço de adição de amostra está
integrado na tampa. O presente dispositivo de ensaio
compreende ademais pelo menos um filtro. O poço de adição
de amostra e o filtro juntos conferem uma melhor separação
10 da amostra. Uma vantagem do poço de adição de amostra
integrado na tampa é que nenhum vazamento pode ocorrer no
poço de adição de amostra. Um poço de adição de amostra
confere proteção contra gotas finas de amostra líquida que
podem respingar durante a adição de amostra.

15 O filtro adicional torna o dispositivo insensível ou
pouco sensível a variações em hematócrito.

O dispositivo de ensaio inclui um filtro para separar
componentes na amostra. Este filtro é preferivelmente uma
membrana polimérica hidrofílica capaz de separar células
sanguíneas vermelhas do plasma, preferivelmente sem
20 hemólise, sem ligação não específica a proteínas, com alta
eficiência de separação, e sem vazamento de células
sanguíneas vermelhas. As membranas de separação Primecare®
(Spectral® Diagnostics Inc., Toronto, ON, Canadá) são
exemplos de tais filtros.

25 Uma lâmina pode ser arranjada nas projeções, assim
definindo exatamente um volume entre as projeções, limitada
por um lado pela superfície do substrato e pelo outro lado
por dita lâmina. Foi surpreendentemente mostrado que a
adição da lâmina influencia a capilaridade da zona de
30 absorção, e pela escolha de um material de lâmina adequado
e adesivos para fixação da lâmina, as propriedades

hidrofílicas da zona de absorção podem ser ajustadas como desejado.

O dispositivo de acordo com a invenção é praticamente fechado, e requer mínima interação pelo usuário. Uma vez
5 que a amostra tenha sido adicionada, o usuário permanece somente para inserir o dispositivo em um aparelho para ler o resultado. Vazamento de amostra proveniente do dispositivo é improvável, o que minimiza os riscos de contaminação do leitor. O dispositivo é de fácil fabricação
10 e, em suas modalidades preferidas, consiste em somente umas poucas partes ou somente dois componentes principais, o suporte e a tampa. A tampa serve para proteger as características do suporte do ambiente, poeira, dano mecânico etc.

Ademais, a construção e o princípio de leitura dos
15 resultados abaixo, através do substrato não poroso, também ajuda na criação de um sistema fechado e protege o leitor de contaminação das superfícies com amostra, por exemplo, uma amostra de paciente, não está acessível ao leitor ou ao
20 usuário. A tampa também proporciona uma área para etiquetas e códigos de barra. Vantagens adicionais do dispositivo incluem que ele não requer desmontagem para determinação do resultado do ensaio.

É, contudo, concebido que o dispositivo possa ter um
25 elemento oposto à tampa. O fundo pode ser visto como um elemento sobre o lado oposto à passagem de fluidos. Um fundo está protegendo o outro lado da base de dano mecânico, contaminação ou similares, que poderiam influenciar a determinação do resultado do ensaio. Um fundo
30 preferivelmente tem uma abertura ou outro meio que habilite a leitura do resultado do ensaio. De acordo com uma

modalidade, não mostrada, o dispositivo tem meios de deslizamento que protegem a base do dispositivo, mas possíveis de serem removidos ou deslocados antes do resultado do ensaio ser determinado. Em uma modalidade o
5 fundo tem pelo menos uma abertura de modo que a base possa ser lida.

Em uma modalidade, o espaço de ar acima da base está em muito pouco contacto com o ar em volta, através, por exemplo, de pelo menos uma abertura pequena. Isto tem a
10 vantagem que ar de dentro será saturado ou quase saturado com vapores de solvente provenientes da amostra e assim previne ou retarda ademais a secura da amostra. Assim esta modalidade particular leva a uma secagem mais lenta da amostra sobre a base. Um exemplo de tal modalidade é uma
15 modalidade com a tampa apertada leve ou um fundo e a tampa.

Com importância, o volume de amostra não é crítico para o desempenho do ensaio, uma vez que é o volume total disponível da zona de absorção e da passagem de fluidos que determina a quantidade de amostra. O ensaio se torna
20 altamente confiável a medida que a zona de absorção, e em uma modalidade preferida, também a passagem de fluidos, consistem em uma estrutura bem definida, possível de ser fabricada em uma configuração idêntica de teste a teste, com nenhuma variação ou variações insignificantes em
25 volume, capacidade ou desempenho .

A figura 1 mostra uma vista explodida de uma modalidade da invenção, onde sobre a superfície de um substrato ou base 1 um caminho de fluxo ou passagem de fluidos 2 é formado por projeções, substancialmente
30 perpendiculares a dita superfície. Estas projeções têm um diâmetro, altura e distância entre elas de tal modo que o

fluxo capilar lateral seja alcançado. As projeções são preferivelmente modificadas com respeito a sua funcionalidade química, biológica ou física, e dadas propriedades hidrofílicas, por exemplo, por meio da adição
5 de dextrana.

Sobre a superfície de substrato, isto é, a superfície de base, é formada uma zona de adição de amostra 3. Dita zona pode conter projeções substancialmente verticais, mas também pode ser uma depressão ou poço no substrato. É
10 concebido que a zona de adição de amostra pelo menos parcialmente contenha ditas projeções substancialmente perpendiculares. A figura 1 esquematicamente mostra uma modalidade onde a adição de amostra contém projeções substancialmente verticais, mas onde ditas projeções
15 substancialmente verticais possuem outras propriedades, por exemplo, dimensões diferentes, de aquelas da passagem de fluidos 2.

Próximo à zona de adição de amostra, na direção de fluxo, um conjugado de detecção é pré-dispensado em uma
20 área 4. Alternativamente, um conjugado de detecção é pré-dispensado na zona de adição de amostra. No final da passagem de fluidos 2 está uma zona de absorção 5, que consiste de projeções substancialmente perpendiculares.

De acordo com uma modalidade preferida, a zona de absorção está coberta por uma lâmina 6, juntamente com a
25 superfície do substrato e as projeções definindo um volume.

Em uma modalidade, existe um dispositivo no poço de adição de amostra prevenindo que uma pipeta seja inserida através do filtro. Em uma modalidade, esta abertura
30 estreita é adaptada à pipeta que se pretende usar juntamente com o dispositivo de modo que a abertura permite

que a pipeta seja inserida completamente através da abertura. Em uma modalidade alternativa, o dispositivo é modelado de modo que a geometria da abertura e da pipeta interage e previne que a pipeta seja inserida de um modo
5 que danifique o filtro.

A figura 1 ademais mostra como uma tampa 7 pode ser arranjada sobre a base 1. A tampa 7 tem pelo menos uma superfície 8 para carregar informação, tal como informação impressa, texto, ilustrações, códigos de barra, etc. Sobre
10 a tampa também é arranjado um poço de adição de amostra 9, tendo um filtro de pré-tratamento de amostra 10.

A vista lateral mostrada na figura 2 ilustra como um filtro de pré-tratamento de amostra está em contacto com as projeções presentes na zona de adição de amostra 3. A vista
15 lateral também indica que a tampa 7 pode ser anexada à base 1 na forma de um fecho de pressão. Também pode ser colada, soldada ou de outra forma anexada à base. Um técnico no assunto escolherá um método adequado para anexar a tampa à base.

20 É também concebido que a tampa se estenda pelo menos parcialmente sobre a superfície do fundo da base, protegendo a base de arranhões, sujeira ou outra contaminação ou outra influência que possa comprometer a leitura do resultado do ensaio.

25 A figura 3 mostra esquematicamente como um fluxo passagem 2 é arranjado sobre uma base 1, dita passagem de fluxo consistindo de projeções substancialmente perpendiculares à superfície da base, e uma zona de absorção, coberta por uma lâmina 6. O detalhe mostra como
30 as dimensões das projeções, diâmetro, altura e distância entre as projeções, são medidas.

A figura 4 mostra uma modalidade alternativa da presente invenção com um fundo 11. Além do fundo é mostrada uma base 1, compreendendo projeções substancialmente perpendiculares a dita superfície. As projeções têm um diâmetro, altura e distância entre elas de tal modo que pelo menos um fluxo capilar seja alcançado. Nesta modalidade particular, existe uma zona de absorção coberta por uma lâmina 6, que juntamente com a superfície da base e as projeções definem um volume. Existe uma cobertura ou tampa 7 protegendo o dispositivo. Na tampa está integrada um poço de adição de amostra 9. Entre o poço de adição de amostra 9 e a zona de adição de amostra 3 é arranjado um filtro de pré-tratamento de amostra 10. O dispositivo compreende ademais um fundo 11 com uma abertura. A abertura permite a leitura da base 1 por um leitor.

Exemplos

Materiais e métodos:

Estruturas micropilares como descrito no documento WO 03/103835 foram produzidos por Åmic AB, Uppsala, Suécia, e usadas para formar a zona de adição de amostra, a zona de reação e a zona de absorção. Estruturas de teste múltiplo foram fabricadas sobre um disco termoplástico, 1 mm de espessura, que foi cortado em tiras, cada uma tendo uma passagem de fluidos ou canal de fluxo aberto consistindo de projeções ou micropilares perpendiculares. O material usado para fabricar o disco foi Zeonor® (Zeon Corp., Japão) um polímero de olefina cíclico tendo excelentes propriedades ópticas.

Uma matriz positiva incluindo as estruturas a serem testadas foi feito por meio de entalhe das estruturas em sílica, e um molde negativo feito em níquel, usando dita matriz de sílica. Estruturas de teste múltiplo foram
5 fabricadas por extrusão termoplástica contra o molde negativo, produzindo as estruturas sobre um disco de polipropileno, 1 mm de espessura, que foi cortado em tiras, cada uma tendo uma passagem de fluidos ou canal de fluxo aberto consistindo de projeções ou micropilares
10 perpendiculares.

Os micropilares tinham as seguintes dimensões: 69 μm em altura, 46 μm em diâmetro e colocados a aproximadamente 29 μm de distância ou distâncias de um ao outro. O canal de fluxo tinha um comprimento de 25 mm e uma largura de 5 mm.
15 Os últimos 5 mm foram usados como suporte para os materiais de absorção, definindo uma zona de absorção de aproximadamente 5 x 5 mm.

Foram dadas as mesmas dimensões para as tiras como de típicas lâminas de microscópio, isto é, 20 x 76 mm, por
20 razões práticas.

O fluxo em estado estacionário foi medido aplicando 10 μL de um tampão, composto de Triton X-100 a 0,25%, BSA a 0,5%, NaCl 0,3M, tampão Tris 0,1 M e pH 7,0, em seqüência cinco vezes. O tempo para o desaparecimento de tampão foi
25 cronometrado. Os últimos cinco foram usados para cálculo em estado estacionário.

Exemplo 1. Fluxo capilar usando microesferas porosas como meios de absorção

30 25 mg de Sephadex G25 seco (médio, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) foram colocados na

extremidade longe do canal de fluxo, dispersados entre as projeções perpendiculares. O fluxo foi medido por adições de tampão como descrito acima. Os resultados são mostrados na Tabela 1:

5

Tabela 1

Adição	Ficha A $\mu\text{L}/\text{min}$	Ficha B $\mu\text{L}/\text{min}$
1	7,1	7,1
2	6,7	7,0
3	6,7	6,8
4	6,9	6,7
5	7,1	7,1

10 Experimentos preliminares usando outra fração das mesmas microesferas, Sephadex G25 (superfina, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) indicaram que o tamanho de partícula significativamente influencia o fluxo.

15 *Exemplo 2. Fluxo capilar usando celulose/filtros de fibra de vidro como meios de absorção*

Um filtro de absorção de 25 mm de comprimento e 5 mm de largura CF6 (Whatman, Maidstone, Inglaterra) foi colocado na extremidade longe do canal de fluxo, repousando sobre as projeções perpendiculares. O fluxo foi medido por meio de adições de tampão como descrito acima. Os resultados são mostrados na Tabela 2:

Tabela 2

Adição	Ficha C $\mu\text{L}/\text{min}$	Ficha D $\mu\text{L}/\text{min}$
1	11	11
2	12	11
3	12	10
4	11	11
5	11	11

Os resultados indicam que uma interface de bom funcionamento foi formada entre a passagem de fluidos, as projeções e o material de filtro de absorção, e que uma taxa de fluxo significativa foi alcançada.

Exemplo 3. Fluxo capilar usando material de espuma como meios de absorção

Espuma de poliuretano foi curada *in situ* sobre o dispositivo, na extremidade longe do canal de fluxo, em uma área consistindo de projeções perpendiculares. A espuma preencheu o espaço entre as projeções, proporcionando boa comunicação de fluidos com o canal de fluxo remanescente. O tempo para que 100 μl fosse absorvido pela espuma foi medido três vezes para diferentes amostras. Os resultados (Tabela 3) mostraram que a espuma pode servir como a zona de absorção e que um fluxo relevante é alcançado. Antecipase que a otimização da espuma em relação à porosidade, cura e outras propriedades, resultarão em taxas de fluxo ainda melhores.

Tabela 3.

Resultados obtidos para ação capilar. O eixo y reporta o tempo para absorver 100 L de água

5	Amostra	tempo 1	tempo 2	tempo 3	Média
	1,1	2,30	4,30	3,10	3,23
	1,2	1,30	2,00	2,00	1,77
	2,1	5,00	5,00	5,00	5,00
	2,2	2,45	3,00	2,55	2,67
	3,1	0,22	0,23	0,30	0,25
	3,2	0,33	0,35	0,38	0,35
	4,1	0,30	0,41	1,05	0,59
	4,2	0,35	0,35	1,05	0,58
	5,1	1,30	1,40	1,45	1,38
	5,2	1,45	1,50	2,15	1,70
	6,1	1,55	2,10	2,15	1,93
	6,2	1,25	2,31	2,33	1,96
	7,1	3,50	4,20	4,30	4,00
	7,2	3,40	4,25	-	2,55
	8,1	4,20	4,49	-	2,90
	8,2	-	-	-	0,00
	3,2-A	2,40	3,10	3,5	3,00
	3,2-B				0,00
	3,2-2				0,00

Exemplo 4. Fluxo dependente de lâmina

As tiras de teste foram produzidas tendo uma passagem de fluidos consistindo em ou levando em uma área de micropilares tendo as seguintes dimensões: 69 μm em altura, 10 46 μm em diâmetro e foram colocados a aproximadamente 29 μm de distância ou distâncias de um ao outro. O canal de fluxo

5 tinha um comprimento de aproximadamente 25 mm e a largura de 4 mm. A extremidade distal - relativa à adição de amostra - foi coberta com uma lâmina de adesivo. Lâminas diferentes tendo adesivos hidrofílicos e hidrofóbicos foram testadas (amostras proporcionadas por Adhesives Research Inc. USA).

O fluxo foi testado usando solução salina tamponada com fosfato com uma adição de Tween-20 a 0,015 %. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

10

Tabela 4

Efeito da lâmina sobre a velocidade do fluxo em uma estrutura micropilar

15	Largura (*):	4 mm	2 mm	Vol. tot.
		Fluxo (µl/min)	Fluxo (µl/min)	(µl)
	Nenhuma			
	(estrutura aberta)	11	7	40
	Lâmina hidrofílica	15	8	30
	Lâmina hidrofóbica	ML	ML	NA

ML = Muito Lenta

NA = Não aplicável

(*) Largura de passagem de fluidos

20

Os resultados mostram que cobrindo a extremidade distal da passagem de fluidos mais larga (4 mm) com uma lâmina hidrofílica a velocidade do fluxo aumentou significativamente. É provável que uma menor melhora alcançada na passagem de fluidos mais estreita (2 mm) seja explicável pelas diferenças estruturais. Na passagem de fluidos estreita, o efeito dos lados expostos se torna

25

maior. Contempla-se que pelo ajuste das propriedades do adesivo, por exemplo, escolhendo diferentes graus de comportamento de umedecimento ou hidrofiliicidade a velocidade do fluxo possa ser exatamente ajustada para
5 vários fluidos de amostra.

Em geral, todos os resultados dos experimentos mostram que o conceito inventivo funciona na prática, e que a provisão de uma zona de absorção aumentou significativamente a capacidade de absorção e velocidade do fluxo em um
10 dispositivo de acordo com a invenção. Os experimentos usando uma lâmina intimamente arranjada sobre projeções ou a estrutura micropilar mostram que não somente esta define o volume mais exatamente como também influencia a velocidade do fluxo.

15 Embora a invenção tenha sido descrita em relação a suas modalidades preferidas que compreendem o melhor modo presentemente conhecido aos inventores, deveria ser entendido que várias mudanças e modificações, como seria óbvio a um técnico com habilidades ordinárias no assunto,
20 poderiam ser feitas sem que se afaste do escopo da invenção como estabelecido nas reivindicações apenas no presente documento.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de ensaio que compreende uma tampa e uma base, dita base compreendendo uma zona de adição de amostra, uma zona de reação e uma zona de absorção, ditos componentes estando em conexão de fluidos e sendo parte de uma passagem de fluidos levando desde a zona de adição de amostra até a zona de absorção, **caracterizado pelo** fato de que:
- a. um poço de adição de amostra está integrado na tampa.
 - b. a zona de absorção compreende uma área sobre um substrato não poroso, tendo projeções substancialmente perpendiculares, ditas projeções definindo um volume, que juntamente com o volume da passagem de fluidos define o volume de amostra submetido ao ensaio,
 - c. a zona de adição de amostra compreende projeções substancialmente verticais a dita base, e
 - d. pelo menos um filtro está entre o poço de adição de amostra e a zona de adição de amostra, em que dito filtro é uma membrana polimérica hidrofílica capaz de separar células sanguíneas vermelhas do plasma, e em que dito filtro está em contacto com projeções substancialmente perpendiculares na zona de adição de amostra.
2. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a passagem de fluidos é uma parte integrada da base.

3. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, **caracterizado pelo** fato de que o dispositivo de ensaio compreende ademais um fundo.

- 5 4. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, **caracterizado pelo** fato de que as projeções têm uma altura, diâmetro e distância entre as projeções de tal modo que o fluxo capilar lateral de dito fluido na zona de absorção
10 seja alcançado.

5. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, **caracterizado pelo** fato de que a área da zona de absorção que tem projeções
15 substancialmente perpendiculares está coberta por uma lâmina.

6. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que a lâmina tem
20 propriedades hidrofílicas.

7. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que a lâmina é anexada às projeções perpendiculares usando uma substância
25 hidrofílica.

8. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, **caracterizado pelo** fato de que a base é transparente, habilitando a leitura do
30 resultado através da dita base.

9. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizado pelo** fato de que compreende o conjugado de detecção pré-dispensado na ou próximo da zona de adição de amostra.

5

10. Dispositivo de ensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, **caracterizado pelo** fato de que o poço de adição de amostra compreende um dispositivo que previne que uma pipeta seja inserida através do filtro.

10

11. Método para manusear amostras de fluidos, **caracterizado pelo** fato de que é usado um dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10.

15

12. Método para realizar um ensaio diagnóstico, **caracterizado pelo** fato de que é usado um dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10.

20

13. Método para o manuseio de amostras de sangue total, **caracterizado pelo** fato de que uma amostra de sangue total é colocada em um poço de adição de amostra, e submetida à separação de células sanguíneas vermelhas usando um filtro, em que o plasma é colocado em contacto com uma passagem de fluidos, compreendendo uma zona de adição de amostra, uma zona de reação e uma zona de absorção, em que a zona de absorção compreende uma área sobre um substrato não poroso tendo projeções substancialmente

25

30

perpendiculares com uma altura, diâmetro e distância entre as projeções de tal modo que o fluxo capilar lateral de dito fluido na zona de absorção seja alcançado, em que o filtro é uma membrana polimérica hidrofílica capaz de separar células sanguíneas vermelhas do plasma, em que o filtro está em contacto com projeções presentes na zona de adição de amostra, e em que o volume da zona de absorção e da passagem de fluidos define o volume de plasma atraído através da zona de reação.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo** fato de que as projeções são cobertas por uma lâmina.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que uma taxa de fluxo é controlada por seleção das propriedades hidrofílicas da lâmina.

1/3

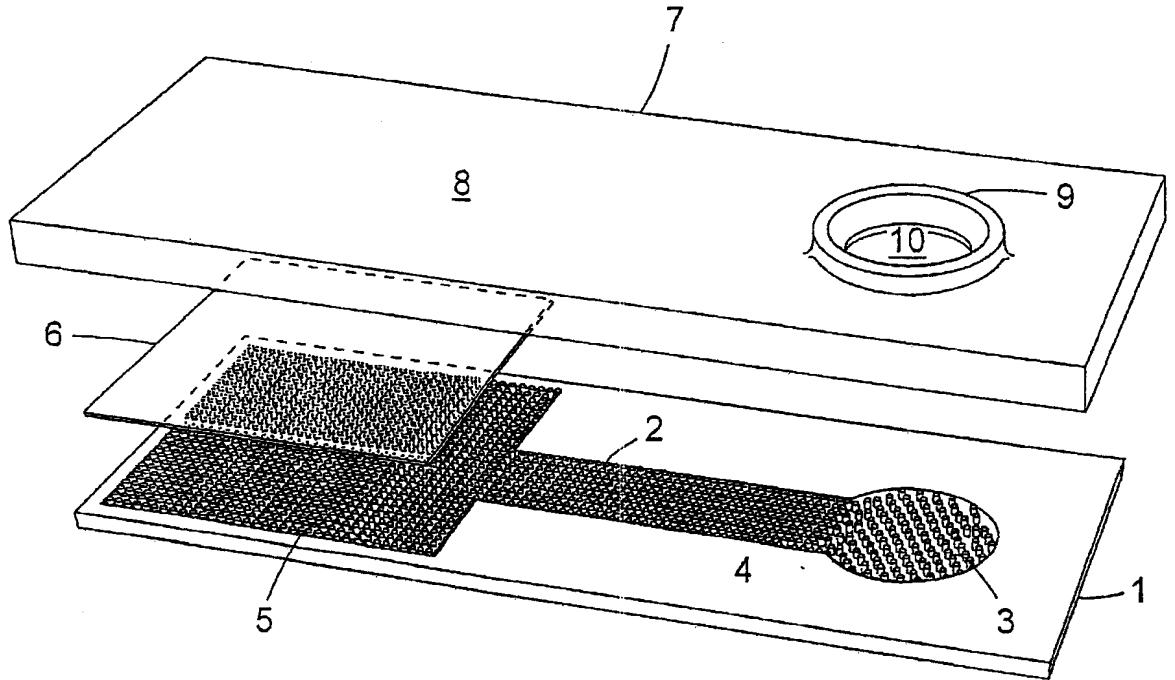


Fig.1

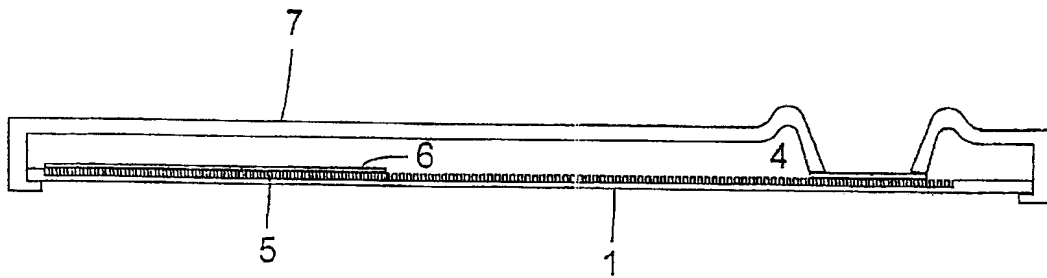


Fig.2

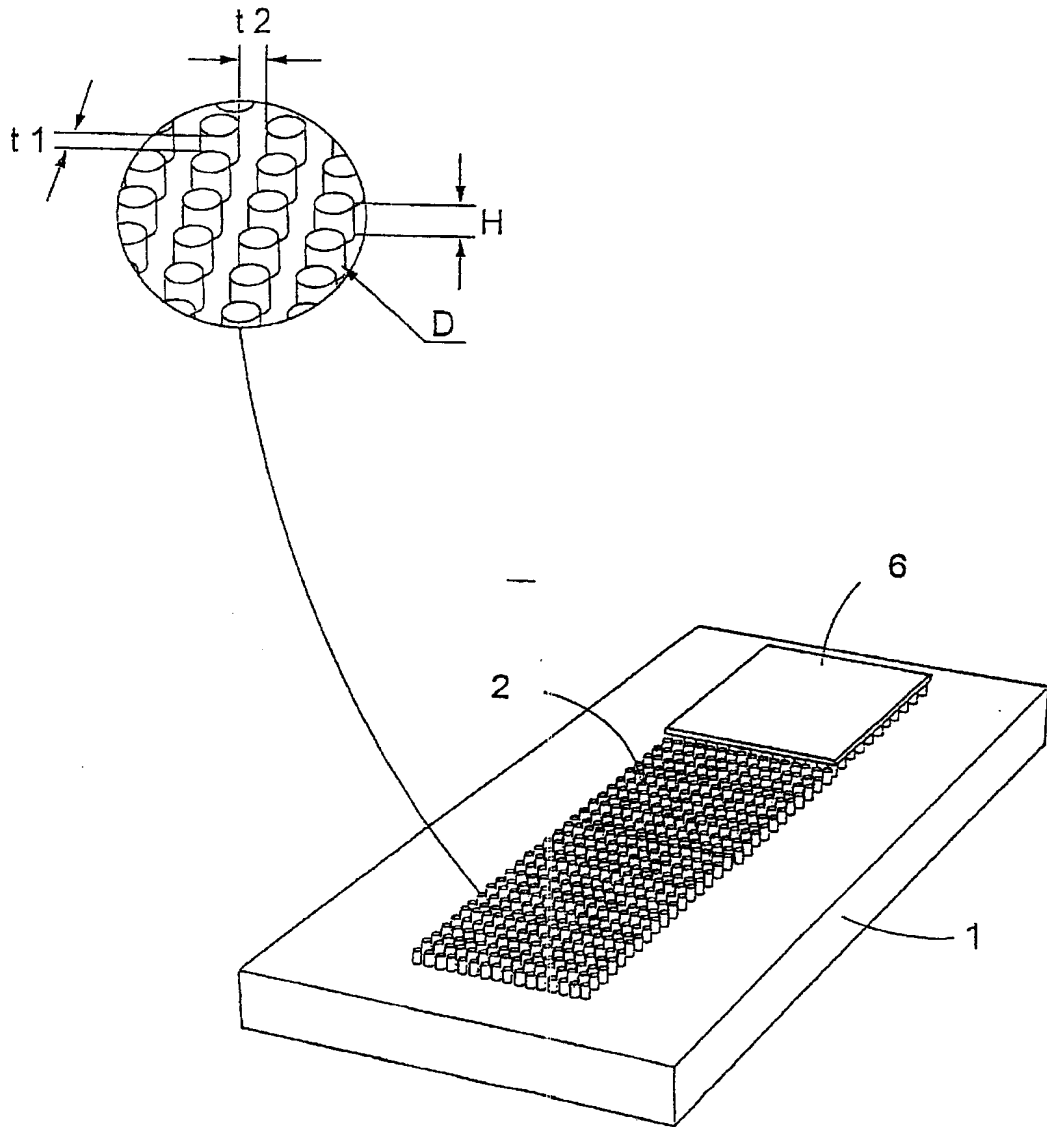


Fig. 3

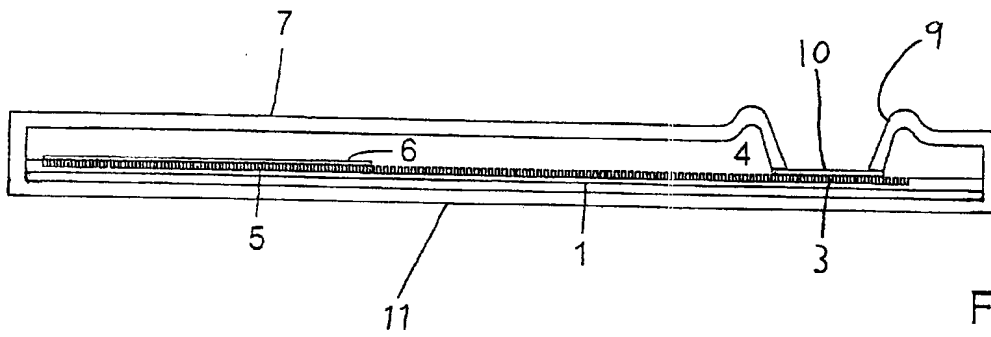


Fig. 4

RESUMO**DISPOSITIVO DE ENSAIO E MÉTODO**

5 É proporcionado um dispositivo de ensaio que
compreende uma tampa e uma base, dita base compreendendo,
uma zona de adição de amostra, uma zona de reação e uma
zona de absorção, ditos componentes estando em conexão de
fluidos e sendo parte de uma passagem de fluidos levando
10 desde a zona de adição de amostra até a zona de absorção,
em que: (a) um poço de adição de amostra está integrado na
tampa, (b) a zona de absorção consiste em uma área sobre um
substrato não poroso, tendo projeções substancialmente
perpendiculares, ditas projeções definindo um volume, que
15 juntamente com o volume da passagem de fluidos define o
volume de amostra submetido ao ensaio, e (c) pelo menos um
filtro está entre o poço de adição de amostra e a zona de
adição de amostra. Ademais, é proporcionado métodos para
manusear amostras.

20