



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0618199-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0618199-6

(22) Data do Depósito: 06/11/2006

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/05/2007

(51) Classificação Internacional: G01N 15/14; G01N 21/03; B01L 3/00

(30) Prioridade Unionista: DE 10 2005 052 752.3 de 04/11/2005

(54) Título: DISPOSITIVO, E, MÉTODO

(73) Titular: CLONDIAG GMBH, Companhia Alemã. Endereço: Löbstedter Strasse 103-105, 07749 Jena, ALEMANHA (DE)

(72) Inventor: EUGEN ERMANTRAUT; RALF BICKEL; TORSTEN SCHULZ; THOMAS ULLRICH; JENS TUCHSCHEERER

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 03/04/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 03/04/2018

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente

15 de Novembro

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

de 1889

“DISPOSITIVO, E, MÉTODO”

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do pedido de patente alemão DE 10 2005 052 752, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade. O presente pedido refere-se ainda ao pedido de patente alemão DE 10 2005 052 713 e aos Pedido de Patente Internacional intitulado “Method and device for the detection of molecular interactions”, depositado em 6 de novembro de 2006 (número de referência Maiwald: C 7794), ambos pedidos sendo incorporados aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a dispositivos e métodos para a detecção de partículas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A detecção da presença e/ou a enumeração de níveis absolutos de uma ou mais espécies de partículas como células ou vírus em amostras tais como fluidos de corpo humano e não-humano são de importância primária na determinação do estado de saúde de seres humanos e mamíferos em geral. Exemplos clinicamente importantes de tais pedidos envolvem a contagem de células CD4+ em indivíduos HIV- positivos, de granulócitos e plaquetas em pacientes tratados com quimioterapia e de leucócitos em sacos de sangue. Aplicações não-médicas, por outro lado, incluem a detecção de contaminantes (bactérias) em amostras de meio- ambiente, tais como águas servidas, ou em produtos alimentícios.

A plataforma analítica principal para realizar tais análises são atualmente os sistemas de ensaio baseados em citometria de fluxo. A citometria de fluxo envolve o suprimento de uma corrente escoando, contendo uma amostra tendo nela partículas alvo, à região de detecção de um citômetro de fluxo. As partículas são dispostas em fila única ao longo de uma corrente

de núcleo, utilizando-se focalização hidrodinâmica dentro de um fluido de
bainha. As partículas são então individualmente interrogadas por um feixe de
luz. Tipicamente, as partículas alvo da região de detecção são irradiadas
utilizando-se um leiser para criar um fenômeno de iluminação pelas partículas
5 alvo. A óptica e eletrônica de detecção mede a absorção, dispersão,
fluorescência e/ou propriedades espectrais de luz das partículas alvo da
amostra ou, alternativamente, as respectivas propriedades de um rótulo
fluorescente fixado às partículas alvo. No caso de fluorescência, cada
partícula alvo produz um surto de fótons de fluorescência, quando ela passa
10 através da região de iluminação. Além disso, a diferenciação da fluorescência
da iluminação ou da luz de excitação pode ser realizada com um filtro ou uma
combinação de filtros. A detecção da fluorescência é conseguida utilizando-se
um tubo fotomultiplicador ou um fotodiodo. Outra técnica baseia-se na
dispersão da luz de fótons no feixe de iluminação pela partícula alvo. A
15 partícula alvo é identificada por sua dispersão de luz em função do ângulo de
dispersão, que é, por sua vez, função de seu tamanho e formato, bem como do
comprimento de onda dos fótons dispersos.

Assim, a detecção e identificação bem sucedidas de uma única
partícula alvo depende de diversos fatores. Primeiro, a potência do leiser deve
20 ser suficiente para gerar um número bastante grande de fótons de
fluorescência (ou alternativamente dispersão) durante a breve passagem da
partícula alvo através da região de irradiação. A detecção da partícula
tipicamente ocorre quando um número suficiente de fótons é gerado, de modo
que o surto fluorescente da partícula alvo é confiavelmente diferenciado das
25 flutuações aleatórias dos fótons de fundo. Segundo, é importante para
minimizar estes fótons de fundo indesejados, originando-se da dispersão ou
da fluorescência emitida pelo líquido veículo da amostra ou impurezas do
líquido, bem como pelo próprio aparelho, tal como as paredes do capilar
através do qual a corrente de fluxo passa.

Os citômetros de fluxo e métodos para seu uso em diferentes aplicações são descritos, por exemplo, em Sharpiro, R. M. (2002) *Practical Flow Cytometry*, 4a. ed., Wiley-Liss, New York, NY; bem como *inter alia* no WO 90/13368. WO 99/44037. e WO 01/59429.

5 Entretanto, sistemas de citometria de fluxo convencionais permanecem largamente inacessíveis para uso clínico de rotina, devido à instrumentação tipicamente volumosa, que não somente faz medições “on site” (p.ex., teste de beira de cama) difíceis, mas também dá origem a elevados custos por análise. Assim, há uma clara necessidade de sistemas
10 mais simples, mais compactos e menos caros, preferivelmente exibindo características de desempenho comparáveis.

 Por conseguinte, nos últimos anos técnicas microfluidas foram empregadas para fins de desenvolver citômetros que requerem menores volumes de amostra e reagente (vide, p.ex., Altendorf, E. et al. (1997) *Sens. Actuat. 1.* 531-534; Huh, D. et al. (2005) *Physiol. Meas.* 26. R73-R98; 15 Dittrich, P.S., and Manz, A. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* 382. 1771-1782). Os instrumentos analíticos baseados nestes esforços são menores e mais portáteis do que os dispositivos convencionais.

 Um exemplo de tal citômetro de fluxo miniaturizado é descrito
20 no Pedido de Patente Internacional WO 02/10713. Este dispositivo utiliza um acionador de fluido sem precisão, que é acoplado ao receptor de fluido de amostra e aos reservatórios para fluidos de suporte, respectivamente, e controlado por um trajeto de realimentação de circuito fechado, assim possibilitando uma instalação instrumental mais compacta.

25 Em vez de utilizar-se a citometria de fluxo, é também possível determinar(em) -se a presença e/ou o número de partículas em uma dada amostra de uma maneira indireta, empregando-se marcadores moleculares (isto é, rótulos) que são específicos para as partículas de interesse e cujo número de cópia da amostra correlaciona-se com aquele das partículas.

Atualmente, diferentes abordagens são disponíveis para realizar tais análises, por exemplo, ensaios baseados em ELISA (vide, p.ex., Kannangal, R. et al. (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8. 1286-1288) bem como métodos baseados em microscopia, envolvendo o uso de contas paramagnéticas revestidas (vide, p.ex., Carella, A.Y. et al. (1995) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2. 623 -625) ou contas de látex revestidas (vide, p.ex., Balakrishnan, P. et al (2004) J Acquir. Immune Defic. Syndr. 36. 1006- 1010). Além disso, é também possível especificamente capturar as partículas rotuladas em uma membrana antes de imageá-las utilizando-se óptica de microscópio (Rodriguez, W.R. et al. (2005) PLOS Medicine 2. e182. 663-672).

Outro tipo de dispositivos de ensaio para contar partículas é descrito no Pedido de Patente Internacional WO 2005/008226. O dispositivo compreende uma fonte de luz projetando luz para dentro de uma sub-área de um chip de amostra contendo as partículas a serem analisadas rotuladas com um corante, e um deslocador para deslocar a posição do chip em uma distância predeterminada em cada intervalo de tempo predeterminado, relativo à lente objetiva e à fonte de luz, respectivamente, de tal maneira que uma certa área adjacente à área fotografada logo antes é deslocada para o ponto em que a luz é incidente. Portanto, as sub-áreas do chip de amostra são fotografadas sucessivamente. O número de partículas de cada sub-área é contado e matematicamente processado para calcular o número total de partículas na amostra.

Além disso, o pedido de patente US 2006/0024756 refere-se a um dispositivo de citometria de formação de imagem compacta para a detecção de partículas ou células alvo magneticamente rotuladas. Para essa finalidade, todas as células presentes em uma amostra biológica a ser analisada são fluorescentemente rotuladas, porém somente as células alvo são também magneticamente rotuladas empregando-se um anticorpo monoclonal unido a contas ferromagnéticas. A amostra rotulada, em uma câmara ou

cadinho, é colocada entre dois ímãs conformados em cunha para seletivamente mover as células magneticamente rotuladas para a superfície de observação do cadinho. Uma LED ilumina as células e uma câmara CCD captura as imagens da luz fluorescente emitida pelas células alvo. Análise de
5 imagem digital fornece uma contagem das células da superfície, que pode ser relacionada com a concentração das células alvo da amostra original.

Entretanto, todos estes dispositivos e métodos descritos acima requerem técnicas de detecção comparativamente sofisticadas, que são caras tanto em termos de custo inicial e manutenção da necessária instrumentação
10 analítica, bem como requerem pessoal altamente treinado. Isto torna o sistema convencional inadequado para práticas médicas de rotina, teste de “beira de cama” ou em locais remotos.

Assim, permanece ainda uma necessidade de dispositivos de ensaio para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de uma ou mais partículas de uma amostra, que superem as limitações supracitadas. Em particular, há
15 necessidade de dispositivos possibilitando a detecção, mesmo de pequenas quantidades (isto é, números), de uma dada partícula, não somente com alta sensibilidade, porém também de uma maneira de fácil realização e custo eficaz.

Além disso, há também necessidade de métodos correspondentes utilizando tais dispositivos de ensaio para a rápida e confiável detecção da presença e/ou a precisa determinação da quantidade de uma ou mais espécies de partículas de uma dada amostra. Em particular, há
20 necessidade de métodos que possam ser realizados “on-site”, isto é, durante ou imediatamente após coleta da amostra a ser analisada.

Portanto, é um objetivo da presente invenção fornecer tais dispositivos de ensaio bem como os correspondentes métodos empregando-os.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um dispositivo para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de partículas, compreendendo uma câmara de reação formada dentro de um corpo de câmara, entre uma primeira superfície e uma segunda superfície, em que a segunda superfície é localizada oposta à primeira superfície; e um ou mais deslocadores, em que a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável via o um ou mais deslocadores, pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície.

10 O um ou mais deslocadores podem ser partes integrantes da primeira superfície e/ou da segunda superfície (“estruturas de deslocamento”) ou podem ser entidades auto-contidas (“corpos de deslocamento”), localizadas na primeira superfície e/ou na segunda superfície. O um ou mais deslocadores pode(m) ser feito(s) de um material elasticamente deformável.

15 Em uma forma de realização preferida, o dispositivo compreende dois deslocadores, que podem ser localizados opostos à mesma ou a diferentes superfícies.

Preferivelmente, pelo menos uma parte da primeira e/ou segunda superfície é feita de um material transparente. Além disso, prefere-se

20 que pelo menos uma ou mais partes da primeira superfície e/ou da segunda superfície seja elasticamente deformável. particularmente preferível, a pelo menos uma ou mais partes elasticamente deformáveis são localizadas opostas ao um ou mais deslocadores. A pelo menos uma ou mais partes elasticamente deformáveis pode(em) ser diferente(s) da área de superfície em que a

25 detecção ocorre.

Em algumas formas de realização, o dispositivo da invenção compreende ainda um ou mais meios que, quando a câmara de reação é elasticamente deformada, permitem manter o volume da câmara de reação essencialmente constante. Preferivelmente, o um ou mais meios são paredes

laterais elásticas, lateralmente eliminando a câmara de reação.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um sistema compreendendo pelo menos duas partes, em que cada uma das pelo menos duas partes compreende uma câmara de reação formada dentro de um corpo de câmara, entre uma primeira superfície e uma segunda superfície, e que a segunda superfície é localizada oposta à primeira superfície; e um ou mais deslocadores, em que a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável via o um ou mais deslocadores, pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície; e em que as câmaras de reação das pelo menos duas partes estão em comunicação entre si.

A câmara de reação, a primeira superfície, a segunda superfície e/ou o pelo menos um deslocador de uma parte do sistema podem ser formados como descrito para o dispositivo inventivo.

Em uma forma de realização, o sistema compreende ainda um ou mais meios que, quando a câmara de reação é elasticamente deformada, permitem manter o volume da câmara de reação essencialmente constante. Preferivelmente, o um ou mais meios são paredes laterais elásticas, delimitando a câmara de reação.

Em uma outra forma de realização, o sistema compreende ainda um sistema de detecção.

Particularmente preferível, o sistema compreende ainda uma passagem de introdução de amostra, em comunicação com cada uma das câmaras de reação dos pelo menos dois dispositivos e, opcionalmente, também um ou mais meios que permitem uma comunicação fluida transitória entre as pelo menos duas câmaras de reação.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de partículas, compreendendo posicionar uma amostra suposta compreender uma ou mais

espécies de partículas a serem detectadas em uma câmara de reação, deslocar pelo menos uma parte da amostra dentro da câmara de reação, via um ou mais deslocadores, e detectar/determinar um valor indicativo quanto à presença e/ou número de uma ou mais espécies de partículas.

5 Preferivelmente, a amostra a ser analisada é uma amostra biológica e a uma ou mais espécies de partículas a serem detectadas são selecionadas do grupo consistindo de células procarióticas, células eucarióticas e partículas virais.

10 Em uma forma de realização preferida, posicionar a amostra em uma câmara de reação compreende introduzir dita amostra dentro da câmara de reação de um dispositivo, de acordo com a presente invenção.

15 Preferivelmente, a pelo menos uma parte da amostra é deslocada variando-se, particularmente preferivelmente por redução, a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície, pela aplicação de pressão à primeira superfície e/ou à segunda superfície, via pelo menos um dos um ou mais deslocadores.

20 Em uma forma de realização preferida do método inventivo, após deslocar pelo menos parte da amostra, a distância reduzida é subsequentemente re-aumentada. Esta redução e subsequente re-aumento da distância podem ser realizados repetidamente. A detecção é preferivelmente realizada após a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície ter sido reduzida.

25 Em uma forma de realização, o método da invenção compreende posicionar uma amostra compreendendo múltiplas partículas em uma câmara de reação, deslocar um subconjunto de ditas múltiplas partículas dentro da câmara de reação, via o um ou mais deslocadores, determinar um ou mais valores indicativos do número de subconjuntos de partículas deslocadas dentro da câmara de reação e, opcionalmente, calcular o número total das

múltiplas partículas dentro da câmara de reação pelos um ou mais valores obtidos durante a detecção.

Em algumas formas de realização, o método ainda compreende posicionar/introduzir um ou mais agentes, cada um compreendendo um ou mais componentes detectáveis dentro da câmara de reação antes de realizar a detecção. Preferivelmente, o um ou mais agentes são selecionados do grupo consistindo de ácidos nucleicos, peptídeos, domínios de proteína, proteínas, carboidratos, compostos químicos de baixo peso molecular e seus análogos e/ou suas misturas e têm afinidade de ligação para uma ou mais partículas a serem detectadas.

Em um primeiro aspecto, a invenção refere-se a um método compreendendo posicionar múltiplas partículas de uma amostra dentro de uma câmara de detecção, deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de detecção, de modo que somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas permaneça, opticamente detectar partículas do subconjunto de múltiplas partículas e, com base nas partículas detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas do subconjunto de partículas.

Em uma forma de realização, o método compreende ainda determinar um valor indicativo de um número de abundância de partículas na amostra, baseado no valor indicativo do número de partículas do próprio subconjunto. Opcionalmente, esta determinação é ainda baseada em um tamanho de um volume de detecção da câmara de detecção.

Em formas de realização preferidas, o método compreende ainda repetir um número NR vezes as etapas de posicionar múltiplas partículas da amostra dentro da câmara de detecção e deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de detecção, de modo que, em cada caso, somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas permaneça, e onde $NR \geq 2$ e, para um número ND das repetições NR, opticamente detectar partículas do subconjunto de múltiplas partículas e, com base nas partículas

detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas do próprio subconjunto de partículas, onde $ND \geq NR$.

Em outras formas de realização preferidas do método inventivo, repetir o número NR vezes as etapas de posicionar e deslocar
5 compreende, para múltiplas das repetições NR, reintroduzir pelo menos algumas das múltiplas partículas deslocadas na câmara de detecção.

Em outra forma de realização preferida da invenção, deslocar algumas das múltiplas partículas compreende reduzir o volume da câmara de
10 detecção que, por sua vez, pode compreender reduzir uma distância entre as primeira e segunda paredes da câmara.

Em uma outra forma de realização, o método inventivo compreende posicionar múltiplas partículas de uma amostra dentro de uma câmara de detecção, deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de
15 detecção, de modo que somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas permaneça, opticamente detectar partículas do subconjunto de múltiplas partículas e determinar a presença de uma partícula alvo entre o subconjunto de partículas.

Em outra forma de realização, o método inventivo compreende posicionar um primeiro múltiplo de partículas de uma amostra dentro de uma
20 câmara de detecção, reduzir o volume da câmara de detecção, opcionalmente detectar partículas dentro da câmara de detecção, com base nas partículas detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas presentes dentro da câmara de detecção, aumentar o volume da câmara de detecção, posicionar um segundo múltiplo de partículas da amostra dentro da câmara de
25 detecção, reduzir o volume da câmara de detecção e, com base nas partículas detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas presentes dentro da câmara de detecção.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um dispositivo compreendendo uma câmara de detecção configurada para receber uma

amostra, compreendendo múltiplas partículas, um acionador configurado para deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de detecção, de modo que somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas permaneça, um detector configurado para detectar partículas do subconjunto de partículas e um processador configurado para determinar, com base nas partículas detectadas, um valor indicativo do número de partículas do próprio subconjunto de partículas.

Preferivelmente, o dispositivo é configurado para operar o atuador, para reintroduzir pelo menos algumas das múltiplas partículas na câmara de detecção e, subsequente, deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de detecção, de modo que somente um segundo subconjunto apropriado das múltiplas partículas permaneça, e o processador é configurado para operar o detector para detectar partículas do segundo subconjunto apropriado e determinar, com base nas partículas detectadas, um valor indicativo do número de partículas do segundo subconjunto apropriado de partículas.

O dispositivo pode ainda compreender um reservatório capaz de receber partículas deslocadas da câmara de detecção e de onde as partículas possam ser reintroduzidas na câmara de detecção.

Em uma forma de realização, o processador pode ser configurado para determinar, com base nas partículas detectadas, a presença de uma partícula alvo entre as partículas do subconjunto de partículas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 é uma vista em seção transversal esquemática de um dispositivo de ensaio inventivo, compreendendo um sistema de detecção óptica.

A Fig. 2 é uma ilustração esquemática de um ensaio inventivo empregando um dispositivo compreendendo dois deslocadores localizados opostos em relação entre si em diferentes lados do dispositivo.

A Fig. 3 é uma ilustração esquemática de um ensaio inventivo, empregando um dispositivo compreendendo dois deslocadores localizados em diferentes posições do mesmo dispositivo.

5 As Figs. 4a e 4B ilustram formas de realização específicas de um dispositivo de ensaio inventivo ou um sistema de ensaio inventivo (A), bem como seu modo de operação (B).

A Fig. 5 representa os resultados de um ensaio de acordo com a presente invenção, para determinar o número de células CD4+ no sangue humano.

10 A Fig. 6 representa uma comparação de números de células CD4+ em sangue humano, como obtida por citometria de fluxo em um ensaio de acordo com a presente invenção, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um dispositivo para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de partículas, compreendendo:

(a) uma câmara de reação formada dentro de um corpo de câmara, entre uma primeira superfície e uma segunda superfície, em que a segunda superfície é localizada oposta à primeira superfície; e

20 (b) um ou mais deslocadores, em que a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável, via o um ou mais deslocadores, pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície.

25 Dentro do escopo da presente invenção, uma “câmara de reação” (aqui também referida como “espaço de reação” ou “câmara de detecção” ou “câmara”) indica o espaço formado dentro de um corpo de câmara, entre uma primeira superfície e uma segunda superfície. A câmara de reação pode ser de qualquer formato básico, por exemplo, circular, elíptico,

quadrático ou retangular. As câmaras de reação preferidas da invenção têm um formato tridimensional cúbico ou cilíndrico. Particularmente preferidas são câmaras de reação sendo configuradas como canais (capilares). Opcionalmente, a câmara de reação pode compreender partes afiladas. Por exemplo, a câmara de reação pode afilar da área central para uma ou ambas as regiões terminais. A câmara de reação é lateralmente limitada pelas paredes laterais. A segunda superfície é localizada oposta ou substancialmente oposta à primeira superfície. Preferivelmente, a primeira e segunda superfícies são dispostas em paralelo ou substancialmente em paralelo entre si.

10 A distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é definida como a distância entre o lado da primeira superfície do dispositivo faceando a câmara de reação e o lado da segunda superfície faceando a câmara de reação e é também referida como espessura da câmara de reação. De acordo com a presente invenção, a espessura da câmara de reação é
15 usualmente no máximo de 1 cm, preferivelmente no máximo de 5 mm, particularmente preferível no máximo de 3 mm e, muitíssimo preferivelmente, no máximo 1 mm.

Em algumas formas de realização da invenção, a câmara de reação é projetada como um vão capilar, que pode ser enchido por meio de
20 forças capilares atuando entre as primeira e segunda superfícies. Usualmente, um vão capilar tem uma espessura de no máximo 1 mm, preferivelmente de no máximo 750 μm e, particularmente preferível, de no máximo 500 μm . Em formas de realização preferidas da invenção, o vão capilar tem uma espessura de 300 μm , com uma espessura de 200 μm sendo mais preferida e uma
25 espessura de 150 μm sendo particularmente preferida.

Nos dispositivos de ensaio de acordo com a presente invenção, a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável. Em formas de realização preferida, a distância é variável em uma faixa de 0 mm a 1 mm. Limites inferiores mais preferidos para a distância entre a primeira

superfície e a segunda superfície são na faixa de 50 μm a 200 μm . Outros limites superiores preferidos são na faixa de 0.3 mm a 0.5 mm.

O termo “deslocador” ou “atuador”, como aqui usado, indica um dispositivo que é adequado para deslocar uma solução dentro da câmara de reação ou pelo menos em uma ou mais partes da câmara de reação de um dispositivo inventivo, na variação da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, em pelo menos uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície. Em outras palavras, o deslocador da invenção pode também ser definido como um dispositivo permitindo o movimento vertical da primeira superfície e/ou da segunda superfície, ou pelo menos uma ou mais de suas partes, em relação entre si. A expressão “pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície”, como aqui usada, é para ser entendida que uma variação da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, via um deslocador, pode não necessariamente ocorrer através da inteira área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície (isto é, uma ou ambas de ditas superfícies como um todo é/são verticalmente movida(s) em relação entre si), porém pode também ser localmente restringida a pelo menos uma parte da área de superfície de uma ou ambas de ditas superfícies (isto é, estas uma ou mais partes da(s) área(s) de superfície da(s) respectiva(s) superfícies é/são movidas verticalmente em relação entre si, enquanto que a distância da uma ou mais partes restantes da(s) área(s) de superfície da(s) respectiva(s) superfície(s) permanece substancialmente constante). Em formas de realização preferidas da presente invenção, a distância entre a primeira superfície e/ou a segunda superfície é reduzida, particularmente preferivelmente pela aplicação de pressão a pelo menos uma parte de uma ou ambas de ditas superfícies.

Um deslocador de acordo com a presente invenção pode constituir uma parte integrante da primeira superfície ou da segunda

superfície (aqui também referida como “estrutura de deslocamento”) ou pode representar uma entidade independente, isto é, auto-contida (aqui também designada “corpo de deslocamento”), localizada do lado de fora da câmara de reação. No caso de um deslocador ser fornecido como uma estrutura de deslocamento, isto é, uma parte integrante da primeira superfície ou da segunda superfície, ele pode ser projetado como uma entidade convexa, estendendo-se para o lado de dentro da câmara de reação. Tal entidade convexa pode ter qualquer formato que seja adequado para provocar um deslocamento de uma solução dentro da câmara de reação, quando realizando o método inventivo. Exemplos de tais formatos convexos incluem, entre outros, um entalhe, uma crista, uma curvatura e um bojo, com o último sendo preferido. De acordo com sua natureza como uma parte integrante da primeira superfície ou da segunda superfície, tal estrutura de deslocamento pode ser feita do mesmo material que o resto da respectiva superfície ou pelo menos uma parte dela.

Em outras formas de realização da invenção, um deslocador constitui um corpo de deslocamento independente, não integrado dentro da primeira superfície ou da segunda superfície, porém localizado oposto a uma de ditas superfícies, em que o deslocador é localizado no lado da respectiva superfície voltada para longe da câmara de reação. Em algumas formas de realização, o deslocador é localizado perpendicular à respectiva superfície da câmara de reação. Tal corpo de deslocamento pode ter qualquer formato que seja adequado, quando aplicado na invenção, para provocar um deslocamento de uma solução dentro da câmara de reação. Exemplos de tais corpos de deslocamento incluem, entre outros, um dedo humano, um bastão, um pino, um êmbolo, um espigão, uma vara, um ressalto e um estêncil, com os últimos dois sendo particularmente preferidos.

Dentro do escopo da invenção, o dispositivo pode compreender um ou mais deslocadores, todos podendo ser partes integrantes

da primeira superfície e/ou da segunda superfície ou podem ser corpos de deslocamento. Entretanto, pode também ser possível que um dispositivo inventivo compreenda pelo menos um corpo de deslocamento e pelo menos uma estrutura de deslocamento, integrada em um de ditas superfícies. Em

5 formas de realização preferidas da invenção, o dispositivo compreende dois deslocadores. Em outras formas de realização, o dispositivo compreende pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos oito ou pelo menos 12 deslocadores.

Todos os deslocadores de um dispositivo inventivo podem ser

10 integrados na e/ou localizados opostos à primeira superfície ou segunda superfície. Alternativamente, é também possível que um dispositivo compreenda pelo menos dois deslocadores que sejam integrados e/ou localizados em ambas de ditas superfícies. Em formas de realização preferidas da invenção, o dispositivo compreende pelo menos dois deslocadores, que são

15 unicamente do tipo de corpo de deslocamento, localizados opostos à primeira superfície e/ou à segunda superfície. Em uma forma de realização particularmente preferida, o dispositivo compreende dois deslocadores, em que ambos os deslocadores são localizados opostos à primeira superfície ou à segunda superfície. Em outra forma de realização particularmente preferida, o

20 dispositivo compreende dois deslocadores também, porém um deslocador é localizado oposto à primeira superfície e o outro deslocador é localizado oposto à segunda superfície. Em uma terceira forma de realização particularmente preferida, os dois deslocadores localizados opostos a diferentes superfícies são também localizados opostos em relação entre si.

25 Os deslocadores podem ser produzidos de qualquer material que seja adequado para provocar um deslocamento pelo menos parcial de uma solução dentro da câmara de reação, preferivelmente aplicando-se pressão à primeira superfície e/ou à segunda superfície, dando origem a uma variação (isto é, uma redução) da distância entre ditas superfícies. Tipicamente, o(s)

deslocador(es) é/são produzidos de um material amorfo. A expressão “material amorfo”, como aqui usada, refere-se a um sólido em que não há ordem de longo-alcance das posições dos átomos, isto é, um material não-cristalino. Exemplos de tais materiais amorfos incluem, entre outros, materiais

- 5 cerâmicos, tais como cerâmica de óxido de alumínio, vidros tais como vidros de boroflutuador, silicone e polímeros sintéticos, tais como poliestireno ou politetrafluoroetileno (TeflonTM). Opcionalmente, o material amorfo pode também ser opticamente transparente, isto é, permeável à luz. Exemplos de materiais transparentes adequados incluem, entre outros, vidros ou materiais
- 10 semelhantes a vidro, tais como vidraça, vidros de boroflutuador, vidros de quartzo, vidro de topázio ou vidro de safira, bem como polímeros sintéticos, tais como polimetilmetacrilato, policarbonato, poliestireno ou acrílica. No caso do dispositivo inventivo compreender mais do que um deslocador, todos eles podem ser produzidos do mesmo material ou pelo menos um deles pode ser
- 15 feito de um diferente material.

- Nas formas de realização preferidas da invenção, pelo menos um dos um ou mais deslocadores é feito de um material elasticamente deformável, isto é, um material que, após ter sido deformado, pelo menos
- 20 substancialmente restaure seu formato original independentemente, sem qualquer outra manipulação externa. Opcionalmente, tais materiais elasticamente deformáveis de acordo com a presente invenção são ainda mais preferidos serem biológica/quimicamente inertes (isto é, não terem ou terem uma muito baixa reatividade em relação a reagentes químicos e/ou biológicos), opticamente transparentes e/ou não autofluorescentes. Exemplos
- 25 de tais materiais incluem, entre outros, elastômeros de silicone, poliuretanos, fosfatos de trietila, acrílicos e acrilatos, com elastômeros de silicone sendo particularmente preferidos. Os elastômeros de silicone são principalmente compostos de polímeros de silicone reticulados. Estes polímeros têm uma cadeia principal Si-O- de fórmula química $[R_2SiO]_n$, em que R representa

grupos secundários orgânicos, tais como metila, etila, fenila ou similar, que podem ser usados para reticular dois ou mais polímeros. Variando-se os comprimentos de cadeia -Si-O-, grupos secundários e reticulando-se, os silicones podem ser sintetizados com uma larga variedade de propriedades e composições. Eles podem variar de consistência de líquido para gel para borracha para plástico duro. Outro grupo de materiais de silicone é baseado em resinas de silicone, que são formadas por oligossiloxanos ramificados e semelhantes a gaiolas. Em uma forma de realização particularmente preferida, o material elasticamente deformável é selecionado do grupo consistindo de uma borracha de silicone e um óleo de silicone. Outros materiais adequados incluem borracha natural, que é a borracha extraída da árvore da borracha do Pará (*Hevea brasiliensis*), bem como outras borracha de composição (comumente também referidas como borrachas sintéticas), que podem ser feitas por polimerização de uma variedade de monômeros, incluindo, p.ex., isopreno (2- metil- 1,3- butadieno), 2- cloro- 1,3- butadieno e metil- propeno, com uma pequena percentagem de isopreno para reticulação. Exemplos de borrachas de composição adequadas incluem, *inter alia*, borracha de estireno-butadieno, borracha de acrilonitrila- butadieno, borracha de uretano, borracha de poliéster, cloropreno, borracha butílica, borracha de epiclорoidrina e borracha de fosfazeno.

Em algumas formas de realização da invenção, a primeira superfície e/ou a segunda superfície compreende(m) uma área de superfície em que a detecção ocorre, isto é, uma área de detecção (aqui também referida como “zona de detecção”). Isto é, a detecção qualitativa e/ou quantitativa da uma ou mais espécies de partículas a serem analisadas é restringida a uma área de superfície distinta de uma ou ambas de ditas superfícies, por exemplo, pode ser possível que a detecção e/ou enumeração das partículas ocorra(m) somente na seção central da primeira superfície e/ou da segunda superfície, provavelmente devido a restrições espaciais do sistema de detecção usado.

Preferivelmente, o volume da seção da câmara de reação, que é limitado pela(s) área(s) de detecção da primeira superfície e/ou da segunda superfície, é sabido permitir análises quantitativas. Em algumas formas de realização da invenção, a “área de detecção” entre a primeira superfície e a segunda superfície é projetada como um vão capilar que é preferivelmente localizado na parte central da câmara de reação, em que a distância entre ditas superfícies nesta área pode opcionalmente ser menor do que a distância nas partes restantes da câmara de reação.

Em outras formas de realização da invenção, pelo menos uma ou mais partes da primeira superfície e/ou da segunda superfície é/são elasticamente deformáveis. Isto é, pelo menos uma ou mais partes da(s) respectiva(s) superfície(s) é/são feitas de um material elasticamente deformável, por exemplo, uma membrana elástica, como descrito acima com respeito a um ou mais deslocadores. Uma membrana elástica particularmente preferida de acordo com a presente invenção é feita de borracha de silicone. Assim, em uma forma de realização, a inteira área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície pode ser feita de um material elasticamente deformável. Em uma forma de realização da invenção, a inteira câmara de reação é elasticamente deformável, isto é, a primeira superfície, a segunda superfície e as paredes secundárias laterais. Preferivelmente, a pelo menos uma ou mais partes elasticamente deformáveis da primeira superfície e/ou da segunda superfície são localizadas opostas ao um ou mais deslocadores. Por conseguinte, todas as áreas de superfície de um dispositivo inventivo, localizado oposto a um deslocador, podem ser elasticamente deformáveis. Entretanto, é também possível que pelo menos uma tal área de superfície, localizada oposta a um deslocador, não seja elasticamente deformável. Em uma forma de realização preferida da invenção, a pelo menos uma ou mais partes elasticamente deformáveis da primeira superfície e/ou da segunda superfície é/são diferentes da(s) respectiva(s) área(s) de superfície,

em que a detecção ocorre.

De acordo com a presente invenção, a primeira superfície e a segunda superfície podem ser feitas do mesmo material ou de diferentes materiais. Além disso, é também possível que a primeira superfície e/ou a
5 segunda superfície compreenda(m) áreas de superfície feitas de diferentes materiais, como o resto da respectiva área de superfície. Por exemplo, uma área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície, tal como uma área de superfície central, opcionalmente retangular (isto é, uma “janela”), é feita de um material transparente, enquanto que o resto da
10 respectiva área de superfície (isto é, a “borda”) é feito de um material não-transparente. Preferivelmente, tal “janela” de material transparente é localizada dentro da região de superfície, onde a detecção ocorre.

Pelo menos uma parte da primeira superfície e/ou da segunda superfície do dispositivo de acordo com a presente invenção pode ser feita de
15 um material amorfo. A expressão “material amorfo”, como aqui usada, refere-se a um sólido em que não há ordem de longo alcance das posições dos átomos, isto é, um material não-cristalino. Exemplos de tais materiais amorfos incluem, *inter alia*, materiais cerâmicos, tais como cerâmica de óxido de alumínio, vidros tais como vidros de boroflutuador, silicone e polímeros
20 sintéticos, tais como poliestireno ou politetrafluoroetileno (Teflon™).

Em formas de realização preferidas da invenção, pelo menos uma parte da primeira superfície e/ou da segunda superfície é feita de um material transparente, isto é, um material permeável à luz. Exemplos de materiais transparentes adequados incluem, *inter alia*, vidros ou materiais
25 semelhantes a vidro, tais como vidraças, vidros de boroflutuador, vidros de quartzo, vidro de topázio ou vidro de safira, bem como polímeros sintéticos, tais como polimetilmetacrilato, policarbonato, poliestireno ou acrílica.

Um dispositivo de acordo com a presente invenção pode ainda compreender um micro-sistema (aqui também referido como “sistema” ou

“elemento de sistema”) sendo disposto na primeira superfície e/ou da segunda superfície da câmara de reação. Como aqui usado, um “micro- sistema” indica um arranjo espacial definido (leiaute) de moléculas de captura (p.ex., uma ou mais espécies de moléculas de sonda ou uma biblioteca de substância) em um suporte (também referido como substrato), em que a posição de cada molécula dentro do micro-sistema é determinada separadamente. Preferivelmente, o micro-sistema compreende locais definidos ou regiões predeterminadas, isto é, chamados elementos ou pontos de sistema, que podem ser arranjados em um padrão particular, em que cada elemento de sistema preferivelmente compreende somente uma espécie de moléculas de captura. O arranjo das moléculas de captura no suporte pode ser gerado por meio de interações covalentes ou não-covalentes. Substratos adequados para micro-sistemas incluem, *inter alia*, lâminas de microscópio, pastilhas ou materiais cerâmicos. Entretanto, as moléculas de captura podem também ser diretamente imobilizadas na primeira superfície e/ou na segunda superfície.

O dispositivo de acordo com a presente invenção pode ainda compreender um ou mais dispositivos, que, quando a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é reduzida, permitem manter o volume da câmara de reação essencialmente constante. Isto é, são providas zonas de compensação (ou “reservatórios”), para as quais qualquer material líquido estando presente na câmara de reação, entre a primeira superfície e a segunda superfície, pode ser deslocado, quando a distância entre ditas superfícies for reduzida. A expressão “essencialmente constante”, como aqui usada, é para ser entendida que, em uma redução da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, o volume da câmara de reação no estado “comprimido” não tem que ser exatamente o mesmo que seu volume original no estado “descomprimido”. Preferivelmente, o volume da câmara de reação no estado “comprimido” é de pelo menos 90% do volume no estado “descomprimido”, particularmente preferível pelo menos 95%. Em algumas

formas de realização da invenção, quaisquer reagentes necessários para realizar os métodos inventivos, tais como agentes compreendendo componentes (isto é rótulos) ou tampões detectáveis, são providos nas zonas de compensação ou reservatórios preferivelmente em forma seca (p.ex., na forma liofilizada como pós, grânulos ou pelotas).

Preferivelmente, isto é realizado provendo-se uma câmara de reação lateralmente delimitada por paredes laterais feitas de um material elástico. De acordo com a presente invenção, uma ou mais paredes laterais pode ser feita de um material elástico. Um material elástico particularmente preferido é borracha de silicone.

Em outra forma de realização, o dispositivo inventivo compreende um corpo de câmara. A expressão “corpo de câmara”, como aqui usada, é entendida indicar o corpo sólido circundando a câmara de reação, que é formada pela primeira superfície, a segunda superfície e as paredes laterais.

A primeira superfície, a segunda superfície e/ou uma ou mais das paredes laterais pode(m) ser parte(s) integrantes do corpo de câmara. Isto é, a(s) respectiva(s) superfície(s) sendo uma parte integrante do corpo de câmara é/são feita(s) do mesmo material que o do corpo de câmara. Alternativamente, uma ou mais da primeira superfície, segunda superfície e/ou uma ou mais paredes laterais, respectivamente, pode(m) ser feita(s) de outro material que não o do corpo de câmara. Dentro do escopo da presente invenção, é assim possível que todas quatro superfícies definindo a câmara de reação sejam feitas do mesmo material, que duas ou três superfícies sejam feitas do mesmo material, enquanto que a(s) superfície(s) restante(s) seja(m) feitas de diferente(s) material(ais), ou que cada superfície seja feita de diferentes materiais.

A primeira superfície e/ou da segunda superfície e/ou uma ou mais paredes laterais delimitando a câmara de reação podem ainda compreender uma ou mais aberturas, que podem ser bloqueáveis e/ou

seláveis, e que podem ser usadas para a introdução direta de uma amostra a ser analisada, bem como quaisquer reagentes adicionais, agentes de detecção ou similares, que podem opcionalmente também ser necessários para realizar o método da invenção. Alternativamente, tais aberturas podem também ser usadas para a fixação de quaisquer módulos adicionais (suplementares) do dispositivo que não foram projetados como partes integrantes do corpo de câmara, tais como, *inter alia*, unidades de enchimento, unidades de processamento, unidades de controle de temperatura, unidades de detecção específicas (isto é, complexas) e recipientes de refugo. Uma conexão entre a câmara de reação e um ou mais módulos adicionais pode ser conseguida, *inter alia*, utilizando-se um ou mais tubos rígidos ou flexíveis, bicos, cânulas, agulhas ou similares, que podem ser fixados à câmara de reação e no módulo adicional, respectivamente, *inter alia*, por meio de encaixe por pressão (também referido como “sistema Luer” ou encaixe por rosca (também referido como “sistema de fecho Luer”), com o último sendo preferido. Ambos os sistemas são bem estabelecidos na arte e comercialmente disponíveis.

O corpo de câmara é preferivelmente feito de pelo menos em parte de um material amorfo, em particular de um material transparente. Materiais adequados incluem, *inter alia*, vidro, materiais sintéticos tais como MacrolonTM, náilon, polimetilmetacrilato, TeflonTM e metais tais como aço de boa qualidade, alumínio e latão. Em algumas formas de realização, o corpo de câmara é feito de material eletricamente condutivo, que é preferivelmente selecionado do grupo consistindo de poliamida com 5 a 30% de fibras de carbono, policarbonato com 5 a 30% de fibras de carbono, poliamida com 2 a 20% de fibras de aço inoxidável e polifenilensulfito com 5 a 40 % de fibras de carbono.

Os dispositivo de acordo com a presente invenção são tipicamente operados como uma única entidade (isto é, individual).

Entretanto, pode também ser possível reunir dois ou mais de tais dispositivos em um sistema de multipartes compreendendo câmaras de reação separadas, a fim de realizar múltiplos ensaios de uma amostra em paralelo, em que um dispositivo como descrito acima corresponde a uma parte ou unidade ou entidade do sistema de multipartes. Assim, em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um sistema, compreendendo pelo menos duas partes, em que cada uma das pelo menos duas partes compreende uma câmara de reação formada dentro de um corpo de câmara entre uma primeira superfície e uma segunda superfície, em que a segunda superfície é localizada oposta à primeira superfície; e um ou mais deslocadores, em que a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável, via o um ou mais deslocadores, pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície. As câmaras de reação das pelo menos duas partes do sistema podem ficar em comunicação entre si.

A expressão “em comunicação entre si”, como aqui usada, indica qualquer interconexção entre as câmaras de reação individuais, direta ou indiretamente via um dispositivo adicional, tal como uma passagem de introdução de amostra comum, unidade de enchimento, unidade de processamento ou similar. Entretanto, como aqui usado, o termo não necessariamente significa que, após introduzir uma amostra, as câmaras de reação fiquem em comunicação fluida permanente entre si.

Em uma forma de realização preferida, o sistema compreende ainda uma passagem de introdução de amostra, que fica em comunicação com cada uma das câmaras de reação dos pelo menos dois dispositivos. A passagem de introdução de amostra (aqui também referida como “zona de carga de amostra” ou “área de amostra”) pode compreender uma ou mais aberturas obstruíveis ou seláveis, como descrito acima, para introduzir a amostra a ser analisada. A passagem de introdução de amostra pode ser configurada como uma câmara de onde as respectivas câmaras de reação

ramificam-se. As aberturas conectando a passagem de introdução de amostra e as câmaras de reação podem ser obstruíveis e/ou seláveis também. Em particular, é preferível evitar-se, após introduzir uma amostra dentro das câmaras de reação separadas de um tal sistema de multipartes, uma contracorrente de líquido de uma câmara de reação para dentro da passagem de introdução de amostra, o que resultaria em uma mistura de soluções de amostra de diferentes câmaras de reação compreendendo reagentes variáveis (tais como moléculas de captura, rótulos e similares) e assim uma interferência com a própria detecção dos múltiplos ensaios individuais a serem realizados em paralelo.

Assim, em uma outra forma de realização preferida da invenção, o sistema compreende ainda um ou mais meios que permitem uma comunicação de fluido transitória entre as pelo menos duas câmaras de reação. É particularmente preferido permitir somente uma comunicação de fluido unidirecional da passagem de introdução de amostra para as câmaras de reação separadas, mas não para trás. Isto pode preferivelmente ser conseguido pela provisão de válvulas de uma direção nas conexões entre a passagem de introdução de amostra e as câmaras de reação, o que evita contracorrente da amostra das câmaras de reação.

Em formas de realização preferidas da invenção, o dispositivo ainda compreende um sistema de detecção, conectado à câmara de reação. Preferivelmente, o sistema de detecção é posicionado oposto à primeira superfície e/ou segunda superfície, opcionalmente em uma região de superfície particular, em que a detecção ocorre.

A seleção de um sistema de detecção adequado depende de diversos parâmetros, tais como a presença opcional de agentes adicionais (p.ex., corantes ou rótulos) usados para detecção ou da espécie de partículas a serem detectadas. Vários sistemas de detecção óptica e não-óptica são bem estabelecidos na arte. Uma descrição geral dos sistemas de detecção que

podem ser usados com a invenção pode ser encontrada, p.ex., em em Lottspeich, F., e Zorbas H. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg / Berlin, Alemanha, em particular nos capítulos 23.3 e 23.4.

5 Em uma forma de realização preferida da invenção, o sistema de detecção é um sistema de detecção óptica. Em geral, realizando-se o método de acordo com a presente invenção, não é necessário o uso de instrumentação sofisticada, mas sem dúvida envolve sistemas de detecção simples, preferivelmente baseados na medição de parâmetros tais como
10 fluorescência, absorção óptica, transferência de ressonância e similares.

Os sistemas de detecção particularmente preferidos de acordo com a presente invenção são baseados nas medições de absorção, tais como turbidimetria e nefelometria (vide, para recapitulação, p.ex., Tiffany, O. (1986) Fluorometry, nephelometry, and turbidimetry, in: Tietz, N. O. (ed.).
15 *Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 78 - 97), que podem ser obtidas com dispositivos fotométricos estabelecidos na arte. Ambos os métodos permitem a determinação da “obscuridade” ou turbidez de uma solução baseada na medição do efeito desta turbidez na transmissão ou dispersão da luz, respectivamente. A turbidez de um líquido é
20 causada pela presença de partículas suspensas nele. Se um feixe de luz for passado através de uma amostra turva, sua intensidade é reduzida. A turbidimetria refere-se à medição da luz não dispersa, isto é, luz que é transmitida através de uma solução turva de partículas, que pode ser realizada usando-se fotômetro padrão. A nefelometria, por outro lado, é a medição da
25 luz dispersa(secundária). Esta técnica requer um instrumento especial, em que o detector é ajustado inclinado ao feixe de luz incidente.

Também preferidos para uso na presente invenção são os sistemas de detecção baseados na comparação das intensidades de fluorescência das partículas espectralmente excitadas, rotuladas com

fluoróforos. A fluorescência é a capacidade das moléculas particulares de emitirem sua própria luz, quando excitadas por luz de um comprimento de onda particular, resultando em um comportamento de absorção e emissão característico. Em particular, a detecção quantitativa de sinais de fluorescência é realizada por meio de métodos modificados de microscopia de fluorescência (para recapitulação, vide, p.ex., Lichtman, J.W., and Conchello, J.A. (2005) *Nature Methods* 2. 910 - 919; Zimmermann, T. (2005) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 95. 245 - 265). Desse modo, os sinais resultantes da absorção e emissão de luz, respectivamente, são separados por um ou mais filtros e/ou dicróitas e imageados em detectores adequados. A análise de dados é realizada por meio de processamento de imagem digital.

O processamento de imagem digital pode ser conseguido com diversos pacotes de software bem conhecidos na arte (tais como Mathematica Digital Image Processing, EIKONA, or Image- PRO). Uma vez que a presente invenção é destinada a ser realizada sem qualquer remoção e/ou substituição de soluções da câmara de reação (isto é, a detecção é realizada na presença de quaisquer rótulos não-ligados dando origem a um segundo plano de sinal não específico), prefere-se utilizar um software de processamento de imagem, permitindo uma correção eficiente e precisa correção de ruído de fundo. Particularmente preferível, a detecção de sinais específicos não é somente conseguida medindo-se diferenças de intensidades de sinal, mas também considerando-se concomitantemente parâmetros adicionais, tais como o “formato” do sinal a ser detectado, que é novamente determinado pelo formato das partículas a serem detectadas. Por exemplo, uma partícula circular, tal como uma célula de formato circular que é rotulada com um anticorpo fluorescente, resultará em um “sinal circular” na imagem registrada durante a detecção óptica. Um software preferido, adequado para tais finalidades, é o Iconoclust software (Clondiag Chip Technologies GmbH, Jena, Alemanha).

Outro sistema de detecção óptica que pode ser usado na presente invenção é a microscopia de fluorescência confocal, em que o objeto é iluminado no plano focal da lente, via uma fonte de luz pontual. Importaneamente, a fonte de luz pontual, detector de luz de objeto e ponto são localizados em planos opticamente conjugados. Exemplos de tais sistemas confocais são descritos em detalhe, p.ex., em Diaspro, A. (2002) *Confocal and 2- photon- microscopy: Foundations, Applications and Advances*, Wiley-Liss, Hoboken, NJ. O sistema óptico de fluorescência da presente invenção é particularmente preferido para representar um microscópio de fluorescência sem um autofoco, por exemplo, um microscópio de fluorescência tendo um foco fixo.

Em dispositivos alternativos de acordo com a presente invenção, meios para realizar uma detecção eletroquímica dos analisados são providos, por exemplo, medindo-se a alteração dos potenciais redox, via elétrodos conectados à primeira superfície e/ou à segunda superfície (vide, p.ex., Zhu, X. et al. (2004) *Lab Chip*. 4. 581- 587) ou por voltometria cíclica (vide, p.ex., Liu, J. et al. (2005) *Anal. Chem.* 11. 2756- 2761; and Wang, J. (2003) *Anal. Chem.* 75. 3941- 3945). Além disso, é também possível fornecerem-se meios para realizar uma detecção elétrica, por exemplo, por medição da impedância (vide, p.ex., Radke, S. M. et al. (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20. 1662- 1667).

Tipicamente, os dispositivos e sistemas de acordo com a presente invenção são auto-contidos, isto é, eles não necessariamente requerem a remoção e/ou substituição da amostra e/ou quaisquer outros reagentes na câmara de reação, enquanto realizando um ensaio. Assim, formas de realização preferidas dos dispositivos e sistemas da invenção somente compreendem uma porta de entrada de amostra, porém não porta de saída.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método

para a detecção qualitativa e/ou quantitativa de partículas, compreendendo:

(a) posicionar uma amostra suposta compreender uma ou mais espécies de partículas a serem detectadas em uma câmara de reação;

5 (b) deslocar pelo menos uma parte da amostra dentro da câmara de reação, via o um ou mais deslocadores; e

(c) detectar/determinar um valor indicativo da presença e/ou número de uma ou mais espécies de partículas.

10 Em formas de realização preferidas da invenção, “posicionar uma amostra em uma câmara de reação” compreende introduzir dita amostra dentro da câmara de reação de um dispositivo ou sistema inventivo, como descrito acima.

Em uma outra forma de realização preferida da invenção, o método compreende:

15 a) posicionar uma amostra, compreendendo múltiplas partículas, dentro de uma câmara de reação;

b) deslocar um subconjunto de ditas múltiplas partículas dentro da câmara de reação, via o um ou mais deslocadores; e

20 c) determinar um ou mais valores indicativos do número do subconjunto de partículas deslocadas na etapa (b).

Opcionalmente, o método compreende ainda:

d) calcular o número total das múltiplas partículas dentro da câmara de reação pelo(s) um ou mais valores obtidos na etapa (c).

25 Em algumas formas de realização da invenção, a detecção/determinação quantitativa da etapa (c) compreende a contagem de uma ou mais espécies de partículas em uma amostra, por exemplo, a enumeração de células de uma amostra biológica.

O termo “amostra”, como aqui usado, refere-se a um líquido que é para ser analisado utilizando-se um dispositivo de acordo com a presente invenção e se supõe compreender uma ou mais espécies de partículas

a serem detectadas. Preferivelmente, a amostra a ser analisada é uma amostra biológica. Exemplos de amostras líquidas que podem ser analisadas utilizando-se a invenção incluem, *inter alia*, soluções químicas orgânicas e inorgânicas, água de beber, águas servidas, fluidos corporais humanos e não-humanos, tais como sangue integral, plasma, soro, urina, catarro, saliva ou fluido cerebrospinal, extratos celulares de animais, plantas ou culturas de tecido, suspensões de células procarióticas e eucarióticas, preparações de fago e similares. A amostra pode ainda compreender um ou mais agentes adicionais, tais como diluentes, solventes ou tampões que podem resultar de uma purificação e/ou processamento opcional da amostra, antes de sua introdução (posicionamento) dentro da câmara de reação.

A amostra a ser analisada pode compreender uma ou mais espécies de partículas a serem detectadas, quando realizando a presente invenção. O termo “partícula”, como aqui usado, indica qualquer entidade tendo um comportamento de ligação específico e/ou uma reatividade característica, que possibilite sua detecção pela realização do método da invenção. Por conseguinte, o termo “partícula” não é somente para ser interpretado em um sentido literal, como referindo-se a partículas “verdadeiras” tais como células ou vírus, mas também para ser entendido como compreendendo moléculas a serem detectadas, em particular macromoléculas (biológicas), tais como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos, bem como seus análogos e/ou misturas tendo afinidade de ligação com quaisquer partículas (sintéticas) presentes na ou adicionadas à amostra a ser analisada.

O termo “espécie” como aqui usado com relação ao termo partículas refere-se a um tipo particular de partícula, isto é, um tipo específico de células ou um fago específico, por exemplo. Desta maneira, a expressão “uma ou mais espécies” indica um ou mais diferentes tipos de partículas, tais como um ou mais diferentes tipos de célula.

Partículas “verdadeiras” de acordo com a presente invenção incluem partículas naturalmente ocorrentes bem como sintéticas. Exemplos de tais partículas naturalmente ocorrentes incluem, inter alia, células procarióticas (p.ex., células bacterianas, tais como *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*), células eucarióticas (p.ex., células de levedura, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, células de insetos, tais como células Sf9 ou High 5. linhagens de célula imortalizadas, tais como células HeLa ou Cos e células primárias, tais como células sangüíneas mamíferas) ou vírus (p.ex., partículas de fago, tais como fago M13 ou T7). Exemplos de partícula sintética incluem, entre outras, contas de poliestireno e contas de látex (paramagnéticas), 10 opcionalmente revestidas com uma ou mais espécies de moléculas a serem detectadas pela presente invenção, em particular uma ou mais espécies de macromoléculas (biológicas), tais como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos ou carboidratos.

15 A amostra a ser analisada pode ser introduzida diretamente dentro da câmara de reação, via uma ou mais aberturas, que podem ser obstruíveis e/ou seláveis, estando presentes na primeira superfície, na segunda superfície e/ou uma ou mais paredes laterais. A amostra pode ser transferida, opcionalmente juntamente com reagentes adicionais, para dentro da câmara 20 de reação pela utilização de um meio de geração de pressão adequado, por exemplo, uma pipeta, uma seringa ou uma unidade automatizada, que pode ser, por exemplo, uma unidade funcional de um aparelho de processamento. Alternativamente, a amostra pode também ser introduzida dentro da câmara de reação por força capilar, sem qualquer manipulação externa, por exemplo, 25 colocando-se a amostra imediatamente adjacente a uma das aberturas estando presentes em qualquer uma das superfícies definindo a câmara de reação.

Em uma forma de realização específica do método inventivo, a amostra é introduzida dentro da câmara de reação por meio de pressão negativa causada pela operação de um ou mais deslocadores. Nesta forma de

realização, inicialmente, isto é, antes de adicionar a amostra, a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície em pelo menos uma ou mais partes da câmara de reação ou, em outras palavras, em pelo menos uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície, é reduzida aplicando-se pressão em direção à primeira e/ou segunda superfícies, via o um ou mais deslocadores. Preferivelmente, a distância é reduzida a um valor de zero ou quase zero. Em seguida dita distância reduzida é reaumetada, preferivelmente ao valor inicial, reajustando-se o deslocador (isto é, movendo-se na direção para trás), assim provocando uma pressão negativa dentro da câmara de reação, que, por sua vez, permite a introdução da amostra dentro da câmara de reação.

O método da presente invenção é destinado a ser realizado sem a necessidade de remover e/ou substituir a amostra e/ou quaisquer outros reagentes na câmara de reação, enquanto realizando-se o método. Em particular, é uma vantagem do método inventivo não serem necessárias etapas de lavagem ou enxágüe, que requereriam tal remoção/substituição, por exemplo, a fim de melhorar a relação sinal-para-ruído do método de detecção usado. Entretanto, algumas aplicações podem requerer a introdução de reagentes adicionais dentro da câmara de reação, tais como um ou mais agentes compreendendo quaisquer rótulos, a fim de permitir mais detecção das partículas de interesse. Tais soluções adicionais podem também ser diretamente introduzidas dentro da câmara de reação, como descrito acima, antes de introduzir a amostra ou concomitantemente com a amostra ou após a amostra ter sido introduzida dentro da câmara de reação. Em formas de realização preferidas, os reagentes adicionais são providos dentro do dispositivo (p.ex., nas zonas de compensação) antes da adição da amostra, particularmente em forma liofilizada/seca, tal como pós, grânulos ou pelotas.

Alternativamente, a introdução da amostra a ser analisada e, opcionalmente, outros reagentes, pode também ser possível em uma maneira

indireta de uma ou mais unidades de enchimento.

Dentro do escopo da presente invenção, uma “unidade de enchimento” indica um meio para encher a câmara de reação, que pode ser uma parte integrada do dispositivo da invenção ou pode ser projetada como uma parte separada, que pode ser fixada à câmara de reação para encher a mesma e separada após uso. Qualquer recipiente, que seja capaz de reter uma amostra de líquido a ser analisada da invenção e que possa ser (reversivelmente) conectada à câmara de reação, pode ser usado como unidade de enchimento. Uma conexão entre a câmara de reação e a unidade de enchimento pode ser conseguida, *inter alia*, por meios tais como tubos, bicos, cânulas, agulhas ou similares, como já descrito acima. Uma dada amostra pode ser introduzida dentro de uma ou mais aberturas obstruíveis e/ou seláveis da unidade de enchimento da mesma maneira como descrito acima para a introdução direta dentro da câmara de reação.

Em formas de realização especiais, uma ou mais cânulas são usadas para conectar uma unidade de enchimento para a câmara de reação do dispositivo. As cânulas usadas penetram na obstrução e/ou vedação de uma ou mais das aberturas compreendidas na câmara de reação. Cânulas preferidas, usadas na invenção, são feitas de aço de alta qualidade ou de polímeros sintéticos e usualmente têm um diâmetro de 0.05 mm a 2 mm. Preferivelmente, duas cânulas são dispostas de tal maneira que uma é usada para introduzir a amostra dentro da câmara de reação e a outra para absorver material gasoso em excesso e/ou líquidos em excesso da câmara de reação (para uma descrição detalhada, vide também o Pedido de Patente Internacional WO 01/02094. cujo conteúdo pertinente é com deste modo explicitamente referido.

A unidade de enchimento pode compreender um recipiente de resíduos integrado ou separado destacável, que serve para absorver substâncias em excesso da câmara de reação. Opcionalmente, o recipiente de

- resíduos compreende um outro meio de carga gasoso, líquido ou sólido, tal como, *inter alia*, celulose, materiais de filtro e géis de sílica, que se liga às substâncias em excesso reversível ou irreversivelmente. Além disso, o recipiente de resíduos pode compreender uma ou mais ventilações de ar ou
- 5 pode ser provido com um vácuo em seu interior para melhorar a transferência de material em excesso para o recipiente de resíduos.

- A unidade de enchimento pode ainda compreender meio mecânico, assegurando que ela precisamente ajuste-se no respectivo local de fixação da câmara de reação, isto é, que a unidade de enchimento seja
- 10 exatamente posicionada em relação à câmara de reação, para permitir conectar a unidade de enchimento à câmara de reação, via uma ou mais cânulas, bicos ou similares, em locais preferidos, tais como as aberturas obstruíveis e/ou seláveis. Exemplos de tal meio mecânico inclui, *inter alia*, fechos de encaixe por pressão ou de mola, especificamente projetados.
- 15 Preferivelmente, o meio mecânico permite separação da unidade de enchimento após introdução da amostra e quaisquer reagentes opcionais dentro da câmara de reação.

- Uma vantagem da presente invenção refere-se ao fato de que os volumes de amostra menores do que 10 μl podem ser analisados.
- 20 Tipicamente, os volumes de amostra são, em uma faixa de 1 a 1.000 μl , preferivelmente em uma faixa de 1 a 100 μl , mais preferivelmente em uma faixa de 1 a 25 μl e, muitíssimo preferivelmente, em uma faixa de 1 a 5 μl .

- As amostras a serem analisadas podem ser introduzidas dentro da câmara de reação sem qualquer outra purificação, uma vez que o
- 25 dispositivo e método inventivos são especificamente projetados para permitir a detecção qualitativa e/ou quantitativa de quaisquer partículas em uma dada amostra, sem a necessidade de realizar etapas de lavagem e enxágüe. Entretanto, em alguns casos pode ser preferível purificar a amostra, pelo menos parcialmente, por exemplo, a fim de remover quaisquer contaminações

brutas que de outro modo interferissem com mais detecção. Tal purificação (parcial) da amostra pode ser realizada de diferentes maneiras, por exemplo, por filtragem da amostra antes de sua introdução dentro da câmara de reação.

Além disso, pode ser necessário diluir um amostra a ser analisada, devido a uma viscosidade comparavelmente elevada, que de outro modo interferiria com a difusão da amostra por toda a câmara de reação do dispositivo inventivo. A diluição da amostra pode ser facilmente conseguida adicionando-se um diluente à amostra. Exemplos de diluentes adequados incluem, *inter alia*, água, solventes orgânicos e inorgânicos, solução salina tamponada- fosfato e similares. O diluente pode ser adicionado antes da introdução da amostra dentro do dispositivo ou pode ser diretamente adicionado dentro da unidade de enchimento e/ou da câmara de reação, como descrito acima.

Após a amostra, e opcionalmente quaisquer reagentes adicionais, ter sido introduzida dentro da câmara de reação ou ter sido transferida da uma ou mais unidades de enchimento para dentro da câmara de reação, a amostra pode opcionalmente ser incubada dentro da câmara de reação por um determinado período de tempo, para permitir difusão por todo o espaço de reação. Tipicamente, o período de incubação é na faixa de 1 s a 30 min, preferivelmente na faixa de 10 s a 15 min e particularmente preferível na faixa de 30 s a 10 min.

Em algumas formas de realização preferidas, o método de acordo com a presente invenção compreende ainda introduzir um ou mais agentes, cada um compreendendo um ou mais componentes detectáveis, dentro da câmara de reação do dispositivo, antes de realizar a etapa (b). Isto é, os agentes compreendendo um ou mais componentes detectáveis podem ser introduzidos dentro da câmara de reação antes de introduzir a amostra, concomitantemente com a amostra ou após a amostra ter sido introduzida diretamente ou via uma unidade de enchimento, como descrito acima.

A expressão “agente compreendendo um ou mais componentes detectáveis”, como aqui usada, refere-se a qualquer composto que compreenda uma ou mais substâncias químicas ou enzimas apropriadas (isto é, um ou mais “componentes”), que direta ou indiretamente gerem um
5 composto o sinal detectável em uma reação química, física ou enzimática. Tal agente pode, assim, ser necessário para ou facilitar a detecção de uma ou mais espécies de partículas de interesse, ao ser capaz de formar interações com ditas partículas.

Como aqui usado, o termo é para ser entendido incluir tanto
10 marcadores detectáveis como tal (também referidos como “rótulos”) bem como quaisquer compostos acoplados a um ou mais de tais marcadores detectáveis.

Em formas de realização preferidas, o um ou mais agentes é/são selecionado(s) do grupo consistindo de ácidos nucleicos, peptídeos,
15 domínios de proteína, carboidratos, compostos químicos de baixo peso molecular e seus análogos e/ou misturas.

Exemplos de ácidos nucleicos que podem ser usados como na presente invenção incluem ácidos nucleicos naturalmente ocorrentes, tais como ácido deoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA), bem
20 como análogos do ácido nucleico, tais como, *inter alia*, ácidos nucleicos de peptídeo (PNA) ou ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Exemplos específicos de ácidos nucleicos naturalmente ocorrentes incluem seqüências de DNA, tais como DNA genômico ou moléculas de cDNA, bem como seqüências de RNA, tais como moléculas de hnRNA ou mRNA ou suas
25 seqüências de ácido nucleico complementares reversas. Tais ácidos nucleicos podem ser de qualquer comprimento e podem ser moléculas de filamento único ou de filamento duplo, com moléculas de filamento único sendo preferidas. Tipicamente, tais ácidos nucleicos usados na invenção têm o comprimento de 10 a 1000 bases, preferivelmente de 15 a 500 bases, mais

preferivelmente 20 a 100 bases e, particularmente preferível, de 20 a 40 bases.

Os peptídeos, domínios de proteína ou proteínas que podem ser usados como agentes de acordo com a presente invenção compreendem moléculas naturalmente ocorrentes, bem como artificialmente projetadas, por exemplo, por meio de tecnologia de DNA recombinante ou via síntese química. Métodos para o projeto e preparação de tais moléculas proteináceas são bem estabelecidos na arte (vide, por exemplo, Sambrook, J. et al. (1989) Molecular, Cloning: A Laboratory Manual, 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Tipicamente, os agentes peptídicos da invenção tem o comprimento de 2 a 200 aminoácidos, preferivelmente 2 a 100 aminoácidos, mais preferivelmente de 5 a 50 aminoácidos e, particularmente preferível, de 10 a 25 aminoácidos.

A expressão “domínio de proteína” como aqui usado refere-se a uma parte de uma sequência de polipeptídeo, que é definida com respeito à função específica que ela exibe, tal como ligação de ligando ou atividade catalítica. Exemplos preferidos de tais domínios de proteína são, *inter alia*, fragmentos- Fab de anticorpos, os domínios de ligação de ligando dos receptores celulares, tais como receptores acoplados à proteína- G, receptores das tirosinas cinases ou nucleares e o domínio das lectinas de ligação de carboidrato.

Exemplos de carboidratos que podem ser usados como agentes na presente invenção incluem monossacarídeos, tais como glicose ou frutose, dissacarídeos, tais como lactose ou sacarose, bem como oligossacarídeos e polissacarídeos, tais como amido, com monossacarídeos sendo preferidos.

A expressão “composto químico de baixo peso molecular”, como aqui usada, indica uma molécula, preferivelmente uma molécula orgânica, compreendendo pelo menos dois átomos de carbono, porém, preferivelmente, não mais do que sete ligações carbono rotativas, tendo um peso molecular na faixa entre 100 e 2000 Dalton, preferivelmente entre 100 e

1000 Dalton e, opcionalmente, incluindo um ou dois átomos de metal. Exemplos de tais moléculas incluem, entre outras, imidazóis, indóis, isoxazóis, oxazóis, piridinas, pirimidinas e tiazóis.

Marcadores ou rótulos detectáveis, que podem ser usados de acordo com a presente invenção, incluem qualquer composto que direta ou indiretamente gere um composto ou sinal detectável em uma reação química, física ou enzimática. Preferivelmente, os rótulos podem ser selecionados, entre outros, de rótulos de enzima, rótulos coloridos, rótulos fluorescentes, rótulos cromogênicos, rótulos luminescentes, rótulos radioativos, haptenos, biotina, complexos metálicos, metais e ouro coloidal, com os rótulos fluorescentes sendo particularmente preferidos. Todos estes tipos de rótulos são bem estabelecidos na arte. Um exemplo preferido de uma reação física que é mediada por tais rótulos é a emissão de fluorescência ou fosforescência na irradiação ou excitação ou na emissão de raios- X, quando utilizando-se um rótulo radioativo. Fosfatase alcalina, peroxidase de rábano silvestre, β -galactosidade e β -lactamase são exemplos de rótulos enzimáticos, que catalisam a formação de produtos de reação cromogênica e que podem ser usados na invenção. Um rótulo de enzima preferido é peroxidase de rábano silvestre, especialmente juntamente com um substrato selecionado do grupo consistindo de 3-amino-9-etilcarbazol, 4-cloro-1-naftol, 3,3'-diaminobenzidina e 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina, com a última sendo particularmente preferida.

Em formas de realização preferidas da invenção, o um ou mais agentes compreendendo um ou mais componentes detectáveis são diretamente acoplados a uma ou mais espécies de partículas a serem detectadas, em que deve ser citado que na invenção tal acoplamento tipicamente não ocorre nas partículas "como um todo" mas em uma ou mais espécies de moléculas particulares, preferivelmente macromoléculas tais como ácido nucleico ou uma proteína, na superfície de ditas partículas. Tal "molécula de superfície"

pode ser uma molécula naturalmente ocorrente na superfície da célula (p.ex., um receptor de superfície celular, tal como um receptor acoplado à proteína-G ou um componente carboidrato particular) ou pode ser artificialmente revestida na superfície de uma partícula, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico (também referida como “molécula de captura” ou “sonda molecular”) acoplada a uma conta paramagnética, por exemplo, via uma ligação biotina/avidina. A reação de rotulação, isto é, a fixação de um ou mais componentes detectáveis a um agente da invenção, pode ser realizada fora do dispositivo inventivo, isto é, antes da introdução da amostra ou diretamente dentro do dispositivo, opcionalmente na unidade de enchimento já descrita acima. A rotulação pode ser conseguida por métodos bem conhecidos na arte (vide, por exemplo, Sambrook, J. et al., supra; e Lottspeich, F., e Zorbas H., supra).

Preferivelmente, o um ou mais agentes, cada um compreendendo um ou mais componentes detectáveis, têm afinidade de ligação para a “molécula de superfície” particular (ou para a partícula como tal), a que eles se ligam. Exemplos de tais agentes incluem, entre outros, anticorpos bem como seus fragmentos (p.ex., fragmentos Fab), moléculas semelhantes a anticorpo (p.ex., anticalinas) e proteínas de ligação de DNA ou RNA, bem como seus fragmentos. Anticorpos adequados ou fragmentos de anticorpo a serem usados na invenção incluem tanto anticorpos primários, que são incitados contra o analisado particular a ser detectado como anticorpos secundários que são incitados contra a imunoglobulina G da espécie animal em que o anticorpo primário foi provocado. A rotulação é realizada acoplando-se os agentes a um ou mais marcadores detectáveis como descrito acima.

Em outra forma de realização preferida, um ou mais agentes, cada um compreendendo um ou mais componentes detectáveis e as “moléculas de superfície” das partículas a serem detectadas (ou de partícula

como tal), são permitidos formar interações moleculares entre si, enquanto estando presentes na câmara de reação. Finalmente, estas interações moleculares são detectadas utilizando-se um apropriado método de detecção.

Após ter introduzido a amostra, opcionalmente juntamente com reagentes adicionais, dentro da câmara de reação, pelo menos uma parte da amostra é deslocada dentro da câmara de reação via o um ou mais deslocadores. O termo “deslocado”, como aqui usado, é para ser entendido que a amostra é movida dentro da câmara de reação variando-se, preferivelmente reduzindo-se, a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície pelo menos em uma ou mais partes da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície, via o um ou mais deslocadores, preferivelmente aplicando-se pressão a uma ou ambas de ditas superfícies ou pelo menos uma ou mais de suas partes. Portanto, está dentro do escopo da presente invenção variar a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície por toda a inteira área de superfície de ditas superfícies ou variar a distância em somente uma parte da área de superfície, tal como em uma extremidade terminal da câmara de reação ou variar a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície em pelo menos duas partes distintas da área de superfície, tal como em ambas as extremidades terminais da câmara de reação.

Uma variação, preferivelmente uma redução, da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é realizada movendo-se verticalmente a primeira superfície e/ou da segunda superfície em relação entre si, via o um ou mais deslocadores. A expressão “movimento vertical”, como aqui usada, indica um movimento de uma ou ambas as superfícies do dispositivo perpendicular ou substancialmente perpendicular a suas respectivas áreas de superfície, assim resultando em uma variação da distância entre elas. Uma variação da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície pode ser conseguida movendo-se verticalmente uma das

duas superfícies em uma ou outra direção ou movendo-se ambas as superfícies simultaneamente em direções opostas. Portanto, uma redução da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície do dispositivo pode ser conseguida movendo-se a primeira superfície ou pelo menos uma ou

5 mais partes dela em direção à segunda superfície, movendo-se a segunda superfície ou pelo menos uma ou mais partes dela em direção à primeira superfície ou movendo-se ambas as superfícies ou pelo menos uma ou mais de suas respectivas partes em direção entre si. Vice versa, um aumento da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície do dispositivo

10 pode ser conseguido movendo-se a primeira superfície para longe da segunda superfície, movendo-se a segunda superfície para longe da primeira superfície ou movendo-se ambas as superfícies para longe entre si. Em particular, prefere-se variar a distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, aplicando-se pressão e/ou tração a uma ou a ambas as superfícies, via dito um

15 ou mais deslocadores. Dentro do escopo da presente invenção, é possível aplicar-se pressão e/ou tração concomitantemente via todos os deslocadores presentes em um dado dispositivo ou via somente pelo menos um deles, enquanto que o outro pelo menos um deslocador permanece não utilizado. Por exemplo, em um dispositivo da invenção compreendendo dois deslocadores é

20 assim possível aplicarem-se pressão e/ou tração a pelo menos uma parte da primeira superfície e/ou da segunda superfície concomitantemente, via ambos os deslocadores ou com somente um deles, a fim de deslocar a amostra dentro da câmara de reação.

Assim, em vista dos diferentes tipos de deslocadores definidos

25 acima, diferentes modos concernentes à variação, preferivelmente redução, da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície (a seguir, as expressões “primeira superfície” e/ou “segunda superfície” devem ser entendidas também referindo-se a pelo menos em uma parte da respectiva área de superfície) são concebíveis, finalmente resultando no deslocamento de

pelo menos uma parte da amostra dentro da câmara de reação.

Primeiro, no caso de um deslocador constituir uma parte integrante da primeira superfície ou da segunda superfície (p.ex., uma estrutura de deslocamento projetada como uma entidade convexa, estendendo-se para o lado interno da câmara de reação) para reduzir a distância entre ditas superfícies, é possível mover-se a respectiva superfície, compreendendo a estrutura de deslocamento, verticalmente em direção à superfície oposta, mover a superfície oposta verticalmente em direção à superfície compreendendo a estrutura de deslocamento ou mover ambas as superfícies verticalmente em relação entre si. Opcionalmente, a superfície oposta à estrutura de deslocamento “integrada” também compreende um deslocador no respectivo (isto é, oposto) local, que pode ser integrado dentro da superfície também ou pode representar um corpo de deslocamento, que será operado como descrito abaixo. Movimento vertical da(s) respectiva(s) superfície(s) pode ser conseguido por um ou mais deslocadores do tipo de corpo de deslocamento ou por um ou mais dispositivos adicionais permitindo o movimento vertical de ditas superfícies. Tais dispositivos podem ser integrados em ou fixados à primeira superfície e/ou a segunda superfície do dispositivo ou podem compreender uma entidade independente. Em algumas formas de realização, o um ou mais meios são selecionados do grupo consistindo de um dedo humano, um bastão, um pino, um ressalto e uma rosca. Se o meio for integrado dentro de um sistema de processamento automatizado, um ou mais meios, tais como uma punção ou um êmbolo conectado à câmara de reação pode ser usado para aplicar pressão na primeira superfície e/ou da segunda superfície. Outro meio para aplicar pressão nas superfícies é simplesmente comprimi-las entre si na mão de uma pessoa.

Segundo, no caso de um deslocador estar presente na forma de um corpo de deslocamento para reduzir a distância entre ditas superfícies, pode ser aplicada pressão à respectiva superfície, oposta à qual o deslocador é

deslocado, movendo-se dito deslocador em direção à superfície, que pode
opcionalmente ser feita de material elasticamente deformável, pelo menos
nesta parte da área de superfície. A deformação (elástica) da respectiva
superfície, isto é, um “movimento” da superfície na direção vertical, via o
5 deslocador, então resulta em uma redução da distância entre a primeira
superfície e a segunda superfície. Opcionalmente, um segundo deslocador
pode ser localizado oposto ao cor de deslocamento acima mencionado no
outro “lado” da câmara de reação. Este segundo deslocador pode ser uma
estrutura de deslocamento integrada dentro da respectiva superfície ou pode
10 ser outro corpo de deslocamento, localizado oposto a ela. O movimento
vertical do segundo deslocador ocorre em direção reversa àquela do primeiro
deslocador.

Reduzindo-se a distância entre a primeira superfície e a
segunda superfície da câmara de reação, pelo menos em uma ou mais partes
15 da(s) área(s) de superfície, resulta em uma redução concomitante
(espacialmente restringida) do espaço de reação nos respectivos locais em que
a distância foi diminuída. Portanto, a amostra a ser analisada torna-se, pelo
menos em parte, deslocada sucessivamente destes locais e é “movida” dentro
da câmara de reação, preferivelmente para as zonas de compensação, o que
20 permite manter o volume da câmara de reação essencialmente constante.

Após ter reduzido a distância entre pelo menos uma ou mais
partes da primeira superfície e da segunda superfície é possível imediatamente
realizar a detecção, como será descrição abaixo.

A expressão “detectar/determinar um valor indicativo quanto à
25 presença e/ou número de uma ou mais espécies de partículas”, como aqui
usada, refere-se à determinação de parâmetros tais como condutividade
elétrica, potencial redox, intensidade de fluorescência ou bioluminescência,
que permitem medições qualitativas e/ou quantitativas de determinadas
partículas de uma amostra. Dentro do escopo da presente invenção, somente

um único destes parâmetros pode ser determinado, porém é também possível determinarem-se mais do que um parâmetro (p.ex., condutividade elétrica e intensidade de um sinal de fluorescência causado por um rótulo adequado), concomitante ou consecutivamente.

5 Preferivelmente, a detecção é realizada na parte da câmara de reação que está localizada entre a(s) área(s) de detecção da primeira superfície e da segunda superfície, como descrito acima. Esta parte da câmara de reação é também referida como “zona de detecção”. Para medições quantitativas, isto é, a contagem de partículas, é assim preferido empregar-se um dispositivo

10 compreendendo uma câmara de reação e uma zona de detecção tendo volumes conhecidos, respectivamente.

Entretanto, neste estágio do método prefere-se re-aumentar a distância entre a pelo menos uma ou mais partes da primeira superfície e da segunda superfície da câmara de reação. É particularmente preferido restaurar

15 a distância original, isto é, a distância antes da reação, entre a primeira superfície e/ou da segunda superfície da câmara de reação. Isto pode ser conseguido por movimento vertical das pelo menos uma estrutura e, opcionalmente, também do meio permitindo movimento vertical de ditas superfícies, como descrito acima, porém em direção reversa, isto é,

20 descontinuando-se a aplicação de pressão nas respectivas superfícies ou áreas de superfície. Opcionalmente, o re-aumento da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície, que foi reduzido em uma dada área de superfície, aplicando-se pressão via um primeiro deslocador, pode ser melhorado reduzindo-se a distância em outra área de superfície, pela

25 aplicação de pressão via um segundo deslocador. Preferivelmente, ambos os deslocadores representam corpos de deslocamento, que podem ser localizados opostos à mesma superfície, isto é, a primeira superfície e/ou da segunda superfície, ou opostos a diferentes superfícies. Re-aumentando-se a distância entre as duas superfícies na pelo menos uma ou mais áreas de superfície da

primeira superfície e/ou da segunda superfície resulta em um aumento concomitante (opcionalmente restringido espacialmente) do espaço de reação entre as duas superfícies. Além disso, a amostra tendo sido deslocada dentro do espaço de reação, preferivelmente nas zonas de compensação providas, 5 será agora difusa de volta na direção inversa. Assim, utilizando-se pelo menos dois deslocadores localizados em diferentes locais da área de superfície da primeira superfície e/ou da segunda superfície, que são operados em direções opostas, como descrito acima, um deslocamento contínuo e, assim, também uma mistura de uma amostra dentro da câmara de reação podem ser 10 conseguidos.

Em uma forma de realização particularmente preferida da presente invenção, a redução subsequente e re- aumento da distância entre a pelo menos uma ou mais partes da primeira superfície e da segunda superfície são repetidos pelo menos duas vezes. A extensão em que a distância entre 15 pelo menos uma ou mais partes da primeira superfície e da segunda superfície é reduzida durante dois ou mais “ciclos de compressão/relaxamento” consecutivos é preferivelmente a mesma. Isto é, a distância entre as duas superfícies no estado comprimido do dispositivo permanece constante. Entretanto, é também possível variar a extensão em que a distância entre pelo 20 menos uma ou mais partes da primeira superfície e da segunda superfície é reduzida durante dois ou mais “ciclos de compressão/relaxamento”, por exemplo, aumentando-se a extensão com um número crescente de ciclos. Preferivelmente, esta redução e re- aumento subsequentes da distância são repetidos até a amostra ser uniformemente distribuída dentro da câmara de 25 reação, isto é, condições de equilíbrio foram estabelecidas, o que é essencial para a confiabilidade das análises quantitativas, tais como a contagem de partículas de uma amostra. Assim, quando realizando a detecção dentro de uma “zona de detecção” particular da câmara de reação, a determinação do valor médio das etapas de detecção repetidas dentro desta área fornecerá uma

medição precisa para o número real de partículas dentro da inteira câmara de reação (desde que os volumes da inteira câmara de reação também, como aquele da “zona de detecção” sejam conhecidos). O número de ciclos de redução e re- aumento, que pode ser realizado, situa-se dentro da opinião do
5 prático. Tipicamente, o número de ciclos está em uma faixa de 2 a 2000. preferivelmente em uma faixa de 10 a 1500. mais preferivelmente em uma faixa de 50 a 1000 e, particularmente preferível, em uma faixa de 100 a 500.

De acordo com a invenção, a detecção/determinação de um valor indicativo quanto à presença e/ou o número da uma ou mais espécies
10 das partículas pode ser realizada após cada ciclo de redução e re- aumento da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície da câmara de reação, em que a detecção é preferivelmente realizada após dita distância ter sido reduzida. Entretanto, é também possível repetir os diversos tempos de
15 detecção, por exemplo, após cada segundo ou cada quinto ciclo de redução/re-aumento. Além disso, é possível realizar a detecção somente uma vez após o término do último ciclo de redução/re- aumento. Em uma forma de realização preferida, a detecção é realizada após cada ciclo de redução/re- aumento. Em
20 outras formas de realização preferidas da invenção, a detecção compreende ainda determinar o valor médio dos resultados obtidos nas etapas de detecção realizadas então, como uma medida permitindo análises quantitativas sendo indicativas do número total de uma ou mais espécies de partículas estando presentes em uma amostra. Por exemplo, após o segundo ciclo de redução/re- aumento, o valor médio dos resultados obtidos após o primeiro e o segundo ciclo de redução/re- aumento, respectivamente, é calculado; após o terceiro
25 ciclo de redução/re- aumento, o valor médio dos resultados obtidos após o primeiro, o segundo e o terceiro ciclos de redução/re- aumento, respectivamente, é calculado, e assim em diante. Os dados obtidos em um ou mais ciclos de detecção podem ser analisados e matematicamente processados empregando-se software de computador apropriado, conhecido por pessoas

hábeis na arte, a fim de determinar a presença e/ou para calcular o número de partículas.

Dependendo do tipo particular de partícula(s) a ser(em) detectada(s), bem como da natureza dos marcadores detectáveis usados, a detecção pode ser realizada por vários métodos, todos eles estabelecidos na arte (vide, por exemplo, Ausubel, F. M. et al., supra; Coligan, J.E. et al. (2000) *Current Protocols in Protein Sciences*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ; e Lottspeich, F., e Zorbas H., supra).

Assim, a realização do método de acordo com a presente invenção geralmente não requer o uso de instrumentação sofisticada ou volumosa, mas sem dúvida envolve sistemas de detecção simples, preferivelmente baseados na medição de parâmetros, tais como fluorescência, absorção óptica, transferência de ressonância e similares. Sistemas de detecção particularmente preferidos de acordo com a presente invenção são baseados nas medições de absorção, tais como turbidimetria e nefelometria, como já descrito acima, que podem ser conseguidas com dispositivos fotométricos estabelecidos na arte. Apesar de sua simplicidade, estes métodos possibilitam determinações precisas, não somente da presença de uma ou mais espécies dadas de partículas em uma amostra, mas também de seu número (para recapitulação vide, por exemplo, Tietz, N. O. (ed.). *Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 78 - 97).

Outros sistemas de detecção particularmente preferidos são baseados em métodos "clássicos" para medição de um sinal fluorescente, tal como microscopia de epifluorescência ou fluorescência de campo escuro (recapitulado, p.ex., em: Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2a. ed., Plenum Publishing Corp., NY).

Outros métodos de detecção de fluorescência que podem ser usados na invenção incluem, entre outros, microscopia de fluorescência interna total (vide, p.ex., Axelrod, D. (1999) *Surface fluorescence microscopy*

with evanescent illumination, in: Lacey, A. (ed.) *Light Microscopy in Biology*, Oxford University Press, New York, 399 - 423), microscopia de formação de imagem de tempo de vida de fluorescência (vide, p.ex., Dowling, K. et al. (1999) *J Mod. Optics* 46. 199 - 209), transferência de energia de ressonância de fluorescência (vide, p.ex., Periasamy, A. (2001) *J Biomed. Optics* 6. 287 - 291), transferência de energia de ressonância de bioluminescência (vide, p.ex., Wilson, T., e Hastings, J. W. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14. 197 - 230), e espectroscopia de correlação de fluorescência (vide, p.ex., Hess, S. T. et al. (2002) *Biochemistry* 41. 697 - 705).

10 Alternativas para os sistemas de detecção acima mencionados incluem instalações de luz branca, como descrito, por exemplo, em WO 00/12759. WO 00/25113. e WO 96/27025; sistemas confocais como descritos, por exemplo, nas US 5.324.633, US 6.027.880, US 5.585.639, e WO 00/12759; sistemas de excitação confocais, baseados em discos Nipkow, 15 como descritos, por exemplo, em US 5.760.950; sistemas de detecção de fluorescência integrados, empregando-se micro- óptica, como descrito, por exemplo, em WO 99/27140; e sistemas de varredura a leiser, como descritos, por exemplo, em WO 00/12759. Uma descrição geral dos métodos de detecção empregando tais sistemas de detecção convencionais podem ser 20 encontrados, por exemplo, em US 5.324.633.

Além disso, como já descrito acima, métodos de detecção eletroquímicos podem ser usados, por exemplo, medindo-se a alteração dos potenciais redox via elétrodos conectados à primeira superfície e/ou à segunda superfície (vide, p.ex., Zhu, X. et al. (2004) *Lab Chip*. 4. 581 - 587) ou por 25 voltometria cíclica (vide, p.ex., Liu, J. et al. (2005) *Anal. Chem.* 11. 2756 - 2761; e Wang, J. (2003) *Anal. Chem.* 75. 3941 - 3945). Além disso, um método de detecção elétrica pode ser empregado, por exemplo, por medição de impedância (vide, p.ex., Radke, S. M. et al. (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20. 1662 - 1667). A detecção pode também ser realizada por meio da detecção

de ondas de superfície acústicas, como descrito, p.ex., em Z. Guttenberg et al. (2005) Lab Chip. 5. 308 - 317.

Em formas de realização específicas da presente invenção, a detecção é realizada utilizando-se FRET ou BRET, que são baseados na respectiva formação de pares extintores de fluorescência ou bioluminescência, de modo que um somente um sinal de fluorescência ocorra, se uma molécula alvo tiver-se ligado a uma molécula de captura imobilizada na matriz porosa. O uso de FRET é também descrito, p.ex., em Liu, B. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102. 589 - 593; e Szollosi, J. et al. (2002) J. Biotechnol. 82. 251 - 266. O uso de BRET é detalhado, por exemplo, em Prinz, A. et al. (2006) Chembiochem. 7, 1007- 1012; and Xu, Y. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96. 151 - 156.

A invenção é ainda descrita pelas seguintes figuras e exemplos, que são unicamente para fins de ilustrar formas de realização específicas desta invenção e não são para ser interpretadas como limitando o escopo da invenção de forma alguma.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

Figura 1

Representa uma ilustração da seção transversal esquemática de um dispositivo de ensaio de acordo com a presente invenção. A câmara de reação do dispositivo é definida pela primeira superfície, segunda superfície, bem como, as paredes laterais, em que pelo menos a área central da segunda superfície é feita de um material elasticamente deformável. O dispositivo ainda compreende um deslocador em forma de um corpo de deslocamento localizado oposto à segunda superfície. A distância entre a primeira superfície e a segunda superfície é variável, aplicando-se pressão à segunda superfície via o deslocador. A câmara de reação é localizada dentro de um corpo de câmara e selada. Um sistema de detecção óptico é localizado oposto à primeira superfície da câmara de reação.

Figura 2

É uma ilustração esquemática de um ensaio inventivo empregando-se um dispositivo compreendendo dois deslocadores na forma de corpos de deslocamento. Um destes deslocadores é localizado oposto à primeira superfície, o outro oposto à segunda superfície do dispositivo. Além disso, os deslocadores são posicionados de tal modo que eles ficam localizados opostos em relação um ao outro. A primeira superfície e a segunda superfície são feitas de um material elasticamente deformável, pelo menos nas respectivas áreas de superfícies, localizadas opostas aos deslocadores. Uma amostra compreendendo múltiplas partículas foi posicionada dentro da câmara de reação, junto com um rótulo tendo afinidade de ligação para uma espécie particular de partículas. Aplicando-se pressão à primeira superfície e a segunda superfície, via os dois deslocadores, a distância entre as ditas superfícies torna-se reduzida na parte central da câmara de reação, causando assim pelo menos um deslocamento parcial da amostra dentro da câmara de reação (preferivelmente zonas de compensação não mostradas). Além disso, reduzindo-se dita distância entre as duas superfícies, um “vão” é formado, em que a detecção das partículas especificamente rotuladas ocorre registrando-se um valor indicativo quanto a sua presença e/ou número. Em seguida, prefere-se reaugmentar a distância entre as superfícies reposicionando-se os dois dispositivos às suas posições originais (isto é, descontinuando-se a aplicação de pressão às superfícies). A amostra deslocada assim “volta” e torna-se re- distribuída por toda a câmara de reação, antes de reduzir a distância novamente. A determinação do valor médio dos resultados obtidos durante as repetidas etapas de detecção realizadas dentro da “zona de detecção” fornecerá uma medida precisa do número total de partículas rotuladas a serem detectadas dentro da inteira câmara de reação (desde que os volumes da câmara de reação, bem como aquele da “zona de detecção” sejam conhecidos).

Figura 3

É uma ilustração esquemática de um ensaio inventivo alternativo, empregando-se um dispositivo compreendendo dois deslocadores na forma de corpos de deslocamento, que estão localizados opostos à mesma superfície (referida abaixo como a “primeira superfície”) nas duas regiões terminais do dispositivo. A parte central da câmara de reação é configurada como um vão capilar, tendo um volume definido. As respectivas áreas de superfície da primeira superfície localizada oposta aos dois deslocadores, são feitas de um material elasticamente deformável. Uma amostra compreendendo múltiplas partículas foi posicionada dentro da câmara de reação, junto com um rótulo tendo afinidade de ligação por uma espécie particular de partículas. Aplicando-se pressão à primeira superfície, via o primeiro deslocador, em uma região terminal da câmara de reação, a distância entre a primeira e a segunda superfícies torna-se reduzida nesta parte da câmara de reação, causando um deslocamento da amostra dentro da câmara de reação em direção a outra região terminal. Conseqüentemente, o respectivo segundo deslocador localizado na outra região terminal, é empurrado pelo líquido deslocado para trás de sua posição inicial, resultando em um aumento da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície nesta parte da câmara de reação. O deslocamento da amostra resulta do posicionamento de um subconjunto distinto das partículas rotuladas presentes na câmara de reação, dentro do vão capilar onde a detecção ocorre. Aplicando-se pressão subsequente à primeira superfície, via o segundo deslocador, a amostra é deslocada dentro da câmara de reação em “direção contrária”, resultando no posicionamento de outro subconjunto distinto de partículas rotuladas dentro do vão capilar. Assim, utilizando-se os dois deslocadores que são operados em direções opostas, um deslocamento contínuo e, assim, também uma mistura da amostra dentro da câmara de reação, são obtidos. Determinando-se o valor médio dos resultados obtidos durante repetidas etapas de detecção

realizadas dentro da “zona de detecção”, o número total de partículas rotuladas, a serem detectadas dentro da inteira câmara de reação, pode ser calculado (desde que o volume da câmara de reação seja bem conhecido).

Figura 4

5 Ilustra uma forma de realização específica dos dispositivos e sistemas inventivos, bem como o correspondente modo de operação. A Fig. 4A (painel de topo) representa esquematicamente um dispositivo singular, ou parte do qual é configurada como um canal definido por uma primeira superfície e uma segunda superfície e correndo para fora em uma extremidade de uma zona de compensação ou reservatório. Pelo menos parte do reservatório é feito de um material elasticamente deformável. Dentro de ditos reservatórios, reagentes (tais como tampões ou rótulos) podem ser fornecidos, preferivelmente na forma seca. Um deslocador é localizado oposto a uma superfície do reservatório (não mostrada). Na extremidade oposta do 10 dispositivo, uma passagem de introdução de amostra (isto é, uma zona de carga de amostra) é fornecida. O canal abrange uma área de detecção particular (isto é, uma zona de detecção). Pelo menos dois de tais dispositivos ou partes podem ser reunidos em um sistema de multipartes, compreendendo câmaras de reação separadas, a fim de realizar múltiplos ensaios de uma 15 amostra em paralelo. As respectivas câmaras de reação estão em comunicação uma com a outra, via uma passagem comum de introdução de amostra. A Fig. 4A (painel central e de fundo) representa duas formas de realização exemplares de tal sistema de multipartes, compreendendo dois e três dispositivos, respectivamente. A Fig. 4B ilustra esquematicamente como a 20 unidade (como um dispositivo único ou como parte de um sistema de multipartes) é operada. O painel de cima é uma visão de uma seção transversal do dispositivo em seu estado inicial. O canal abrangendo uma área de detecção particular é delimitado por uma primeira superfície rígida (hachurada) e uma segunda superfície feita de um material elasticamente 25

deformável (“membrana de cobertura”). Um deslocador (“estêncil”) é pressionado em direção à segunda superfície do reservatório, resultando em uma redução da distância entre a primeira superfície e a segunda superfície nesta área de superfície, preferivelmente em um valor de zero ou quase zero.

- 5 Uma gota de uma amostra líquida é colocada na passagem de introdução de amostra e introduzida dentro da câmara de reação, por meio de pressão negativa, resultante de uma liberação do deslocador (isto é, movendo-o na direção contrária), causando assim um relaxamento do reservatório (Fig. 4B, painel central). Finalmente, o deslocador é novamente pressionado em direção
- 10 à segunda superfície do reservatório. Assim, por outra redução da distância entre as duas superfícies nesta área de superfície, a amostra torna-se, pelo menos em parte, deslocada dentro da câmara de reação. Portanto, repetindo-se a compressão consecutiva e o relaxamento do reservatório, uma agitação/mistura da amostra pode ser realizada antes da detecção de uma ou
- 15 mais espécies de partículas serem formadas (Fig. 4B, painel de baixo).

Figura 5

- Representa o resultado de um ensaio de acordo com a invenção para determinar o número de células CD4+ no sangue humano. As células CD4+ da amostra de sangue humano foram rotuladas com um
- 20 anticorpo monoclonal conjugado com ficoeritrina anti- CD4, empregando-se o kit CD3CD4 (GE Healthcare Life Sciences, Heidelberg, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra de sangue foi diluída em uma concentração de menos do que 500 células/ μ l e analisada em uma câmara de reação configurada como um canal capilar que é feito de
- 25 polidimetilsiloxano. A câmara de reação tem um volume total de aproximadamente 2 μ l. Após introduzir a amostra dentro da câmara de reação, por meio de forças capilares, ela foi agitada aplicando-se pressão a uma superfície da câmara de reação via um ressalto, causando assim um deslocamento parcial da amostra. O deslocamento da amostra de tal maneira

foi repetido 10 vezes. As células rotuladas foram analisadas por meio de detecção óptica, empregando-se um microscópio (Akioskop; Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) com uma objetiva de 10 X (campo de imagem 1727 x 1385 μm) e um filtro F1- FITC (Zeiss #09). O tempo de exposição foi de 2500 ms. A detecção foi repetida 5- 7 vezes. Uma imagem microscópica representativa é mostrada. O número de células CD4+ na amostra foi determinado, utilizando-se um pacote de software de computador apropriado (software Image J, versão 1,71, um programa de processamento de imagem Java de domínio público, influenciado pela imagem NHI), calculando-se o valor médio do número de células obtidas para as medições individuais. Uma vez que o campo de imagem e, assim, o volume da “zona de detecção”, bem como o volume da câmara de reação eram conhecidos, a concentração da amostra de células/ μl CD4+ pôde ser calculada.

Figura 6

Representa uma comparação de números de células CD4+ em sangue humano, como obtida por citometria de fluxo, e um ensaio de acordo com a invenção, respectivamente. As células CD4+ de uma amostra de sangue humano foram rotuladas, como descrito na Fig. 5. As amostras foram analisadas usando-se um citômetro de fluxo Guava PCA (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA; comprimento de onda de excitação: 532 nm, comprimento de onda de emissão: 580- 583 nm) de acordo com as instruções de fabricante, bem como, por um ensaio inventivo como descrito na Fig. 5. Os resultados são valores médios $\pm$ SEM de 5- 7 medições e são expressos como números de células CD4+ por μl de sangue.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Determinação da presença de células CD4+ em sangue humano.

As células CD4+ de uma amostra de sangue humano, foram rotuladas com anticorpo monoclonal conjugado com ficoeritrina anti- CD4

(CD4- PE), empregando-se o kit CD3CD4 (GE Healthcare Life Sciences, Heidelberg, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. Em resumo, 10 µl de sangue foram misturados com 2 µl de CD4- PE (solução de estoque diluída 1:25) e 2 µl de 20 mM EDTA. Em seguida, a mistura foi incubada por 5 15 minutos no escuro. A amostra de sangue foi diluída em uma concentração de menos do que 500 células/µl (uma concentração mais elevada interferiria com o manuseio apropriado do dispositivo) e analisada em uma câmara de reação configurada como um canal capilar que é feito de polidimetilsiloxano, isto é, um material elasticamente deformável. A câmara de reação tem o 10 tamanho de 2,048 x 0,04 mm x 24 mm e, assim, tem um volume total de aproximadamente 2 µl.

Para introduzir a amostra, 2,5 µl da amostra de sangue diluído foram colocados adjacentes à abertura do canal e introduzidos por forças capilares sem outra manipulação externa. Posteriormente, a câmara de reação 15 foi agitada aplicando-se pressão em uma superfície da câmara de reação, via um ressalto (ou um fórcepe), causando assim um deslocamento parcial da amostra. O deslocamento da amostra de tal maneira foi repetido 10 vezes.

As células rotuladas foram analisadas por meios de detecção óptica, usando-se um microscópio (Akioskop; Carl Zeiss GmbH, Jena, 20 Alemanha) com uma objetiva de 10 x (campo de imagem 1727 x 1385 µm) e um filtro F1- FITC (Zeiss #09). O tempo de exposição foi de 2500 ms. A detecção foi repetida 5- 7 vezes. Uma imagem microscópica representativa é mostrada na Fig. 5.

O número de células CD4+ na amostra foi determinado, 25 utilizando-se um pacote de software de computador apropriado (software Image J, versão 1,71, um programa de processamento de imagem Java de domínio público, influenciado pela imagem NHI), calculando-se o valor médio do número de células obtidas para as medições individuais. Uma vez que o campo de imagem e, assim, o volume da “zona de detecção”, bem

como, o volume da câmara de reação eram conhecidos, a concentração da amostra de células/ μl CD4+ pôde ser calculada.

Exemplo 2: Comparação da citometria de fluxo e um ensaio inventivo para determinar o número de células CD4+ em sangue humano.

A fim de testar a adequabilidade do ensaio inventivo para análises quantitativas, ele foi comparado com citometria de fluxo convencional, para determinar o número de células CD4+ no sangue humano. As células CD4+ de uma amostra de sangue humano foram rotuladas como descrito no Exemplo 1. As amostras foram analisadas usando-se um citômetro de fluxo Guava PCA (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA; comprimento de onda de excitação: 532 nm, comprimento de onda de emissão: 580- 583 nm) de acordo com as instruções do fabricante, bem como por um ensaio inventivo como descrito no Exemplo 1. Os resultados são mostrados na Fig. 6 e representam os valores médios $\pm$ SEM de 5- 7 medições. Os resultados são expressos como números de células CD4+ por μl de sangue.

Os valores médios obtidos para os dois métodos, bem como as respectivas diferenças percentuais, também são resumidos na seguinte tabela.

Ensaio número	Fluxo Médio	Ensaio Médio	Δ [%]
1	1234	1114	9,78
2	1208	1330	9,14
3	1212	1245	2,66
4	1198	1162	3,01
5	1169	1131	3,34
6	1011	710	29,83
7	1118	1064	4,85
8	1008	968	4,03
9	1058	1170	9,58

Como pode ser visto, em cinco de nove ensaios independentes realizados, a variação entre os dois métodos é menor do que 5 %, em três casos ela é menor do que 10 %. Apenas no Ensaio no. 6 uma variação mais elevada de cerca de 30 % foi obtida, que pode ser resultado do fato de que,

neste caso, as duas análises não foram realizadas em paralelo, isto é, com amostras de sangue idênticas. O outro resultado, entretanto, indica claramente a adequabilidade do método inventivo para a detecção quantitativa de partículas em amostras biológicas.

5 A presente invenção ilustrativamente descrita aqui pode adequadamente ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, não especificamente descritos aqui. Assim, por exemplo, os termos “compreender”, “incluir”, “conter”, etc. serão lidos expansivamente e sem limitação. Adicionalmente, os termos e expressões
10 empregados aqui têm sido usados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes dos aspectos apresentados e descritos ou partes deles, porém reconhece-se que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que, embora a presente
15 invenção tenha sido especificamente descrita por formas de realização e aspectos opcionais preferidos, a modificação e variação das invenções personificadas ali aqui descritas podem ser lançadas mão por aqueles hábeis na arte e aquelas tais modificações e variações são consideradas estando dentro do escopo desta invenção.

20 A invenção foi ampla e genericamente descrita aqui. Cada uma das espécies mais limitadas e agrupamentos subgenéricos situando-se dentro da descrição genérica também fazem parte da invenção. Isto inclui a descrição genérica da invenção, com uma condição ou limitação negativa removendo qualquer assunto do gênero, independente ou não de o material excisado ser
25 especificamente citado aqui.

 Outras formas de realização estão dentro das seguintes reivindicações. Além disso, onde características ou aspectos da invenção são descritos em termos de grupos Markush, aqueles hábeis na arte reconhecerão que a invenção também é descrita desse modo em termos de qualquer
30 membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo, caracterizado pelo fato de compreender:

- uma câmara de detecção configurada para receber uma amostra compreendendo múltiplas partículas rotuladas,

5 - um atuador configurado para deslocar algumas das múltiplas partículas da câmara de detecção, de modo que somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas rotuladas permaneça,

- um detector configurado para detectar partículas do subconjunto de partículas rotuladas, e

10 - um processador configurado para determinar, com base nas partículas detectadas, o número de partículas do subconjunto apropriado de partículas,

em que o dispositivo é configurado para operar o atuador para

(a) reintroduzir pelo menos uma parte das múltiplas partículas rotuladas deslocadas na câmara de detecção e, subsequentemente, (b) deslocar uma parte das múltiplas partículas rotuladas da câmara de detecção, de modo que somente um segundo subconjunto apropriado das múltiplas partículas rotuladas permaneça e o processador seja configurado para operar o detector para detectar partículas do segundo subconjunto apropriado e determinar, com base nas partículas detectadas, o número de partículas do segundo subconjunto apropriado de partículas,

em que o processador é ainda configurado para determinar o número ou abundância de partículas na amostra, com base no número de partículas do subconjunto apropriado.

25 2. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda um reservatório capaz de receber partículas deslocadas da câmara de detecção e da qual as partículas podem ser reintroduzidas na câmara de detecção, em que o reservatório compreende uma parede expansível.

3. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processador é configurado para determinar, com base nas partículas detectadas, a presença de uma partícula alvo entre as partículas do subconjunto de partículas.

5 4. Método, caracterizado pelo fato de compreender:

- posicionar múltiplas partículas rotuladas de uma amostra dentro de uma câmara de detecção,

- deslocar algumas das múltiplas partículas rotuladas da câmara de detecção, de modo que somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas rotuladas permaneça,

- opticamente detectar partículas do subconjunto de múltiplas partículas rotuladas e

- com base nas partículas detectadas, determinar o número de partículas do subconjunto de partículas, e

- repetir um número NR vezes as etapas de posicionar múltiplas partículas da amostra dentro da câmara de detecção e deslocar algumas das múltiplas partículas rotuladas da câmara de detecção, de modo que, em cada caso, somente um subconjunto apropriado das múltiplas partículas rotuladas permaneça, e onde $NR \geq 2$, e, para um número ND das repetições NR, opticamente detectar partículas do subconjunto de múltiplas partículas e, com base nas partículas detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas do próprio subconjunto de partículas, onde $ND \geq NR$, e

- determinar o número ou abundância de partículas na amostra, com base no número de partículas do subconjunto apropriado.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a determinação do número ou abundância de partículas na amostra ser ainda baseada em um tamanho de um volume de detecção da câmara de detecção, o número de partículas do subconjunto sendo indicativo do número

de partículas presentes no volume de detecção da etapa de opticamente detectar.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de $ND \geq 5$, preferencialmente $ND \geq 10$ e $NR \geq 5$.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender ainda determinar o número ou abundância de partículas na amostra, com base em um número NV dos valores NR indicativos do número de partículas do subconjunto apropriado, em que preferencialmente $ND \geq 10$ e $NR \geq NV \geq 5$.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de repetir o número NR vezes as etapas de posicionar e deslocar compreender, para múltiplas repetições NR, reintroduzir pelo menos parte das múltiplas partículas deslocadas para a câmara de detecção.

15 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de ainda compreender receber partículas deslocadas da câmara de detecção dentro de um reservatório em comunicação fluida com a câmara de detecção.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a recepção compreender expandir uma parede do reservatório.

20 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a reintrodução compreender contrair uma parede do reservatório.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de o deslocamento de algumas das múltiplas partículas compreender reduzir um volume da câmara de detecção.

25 13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a redução do volume da câmara de detecção compreender reduzir a distância entre as primeira e segunda paredes da câmara.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a etapa de opticamente detectar compreender detectar luz que

passou através da primeira parede.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, antes da substituição, a câmara de detecção ter um volume inicial, após o deslocamento da câmara ter um volume deslocado, e uma
5 relação dos volumes deslocados para inicial ser de 0,25 ou menos, preferencialmente 0,15 ou menos, mais preferencialmente 0,05 ou menos.

16. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de a amostra ser uma amostra líquida, antes de substituir um volume inicial da amostra estar presente dentro da câmara de detecção, a etapa de
10 deslocar compreender deslocar pelo menos parte da amostra líquida da câmara de detecção, e uma relação do volume da amostra restante para o volume da amostra deslocada ser de 0,25 ou menos, preferencialmente 0,15 ou menos, mais preferencialmente 0,05 ou menos.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de a etapa de reintroduzir compreender reintroduzir pelo menos
15 50%, preferencialmente pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90% da amostra deslocada dentro da câmara de detecção.

18. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de deslocar algumas das múltiplas partículas compreender reduzir
20 um volume da câmara de detecção, que preferencialmente compreende reduzir uma distância entre a primeira e a segunda paredes da câmara.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a etapa de opticamente detectar compreender detectar luz que
25 passou através da primeira superfície.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de, antes da substituição, a câmara de detecção ter um volume inicial, após o deslocamento da câmara ter um volume deslocado, e uma
relação dos volumes deslocado para inicial ser de 0,25 ou menos,

preferencialmente 0,15 ou menos, mais preferencialmente 0,05 ou menos.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 20, caracterizado pelo fato de as partículas serem células, e em que a amostra preferencialmente inclui pelo menos algum material sanguíneo.

5 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de compreender:

- posicionar um primeiro múltiplo de partículas rotuladas de uma amostra dentro de uma câmara de detecção,

- reduzir um volume da câmara de detecção,

10 - opticamente detectar partículas dentro da câmara de detecção,

- com base nas partículas detectadas, determinar o número de partículas presentes dentro da câmara de detecção.

- aumentar um volume da câmara de detecção,

15 - posicionar um segundo múltiplo de partículas rotuladas da amostra dentro da câmara de detecção,

- reduzir um volume da câmara de detecção, e

- com base nas partículas detectadas, determinar um valor indicativo do número de partículas presentes dentro da câmara de detecção.

FIG.1

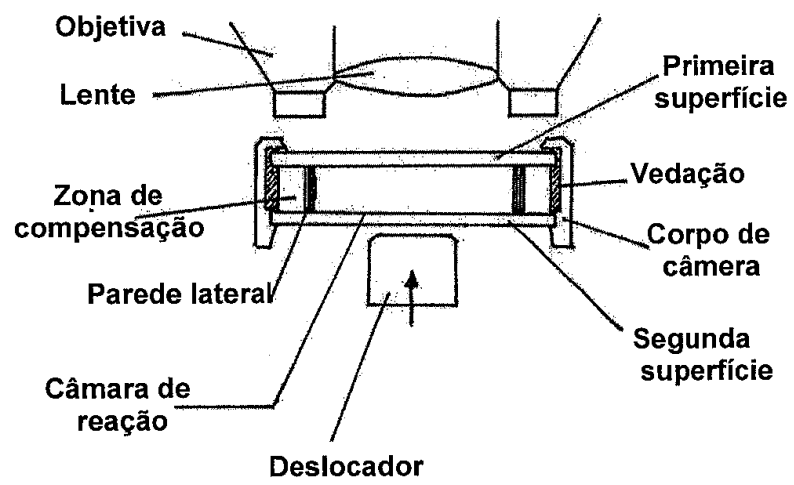


FIG. 2

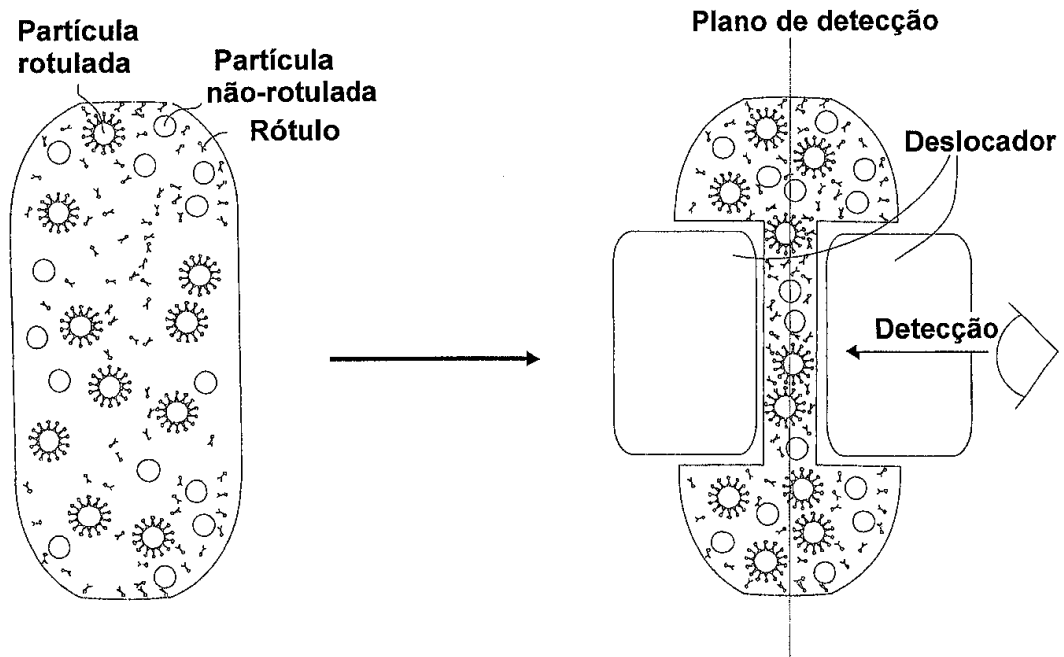


FIG. 3

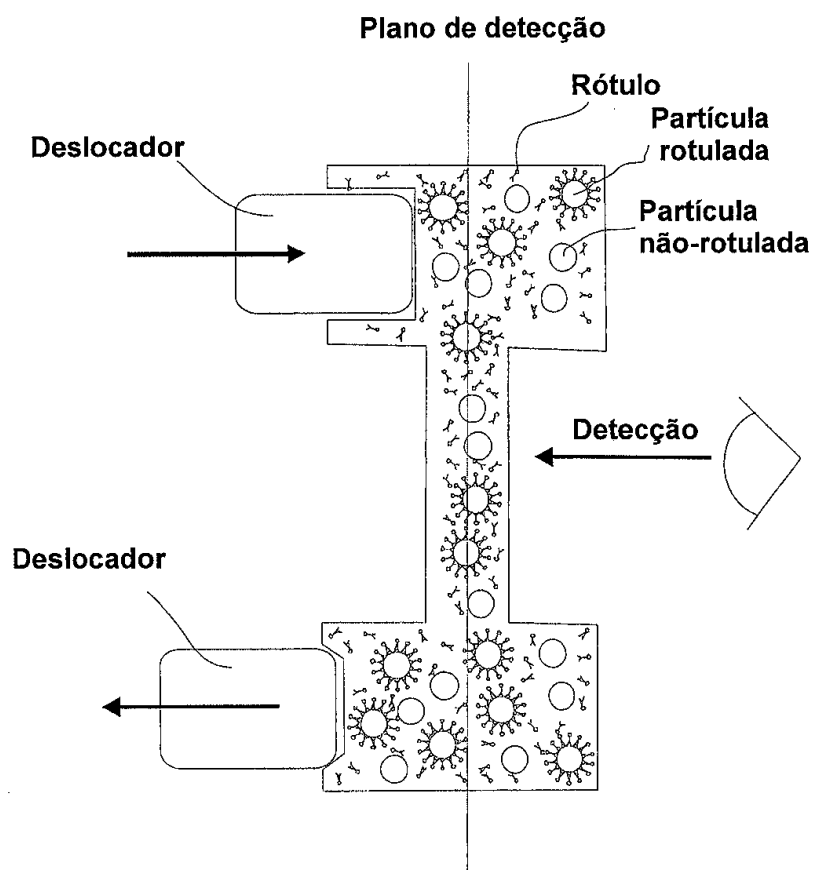


FIG. 4A

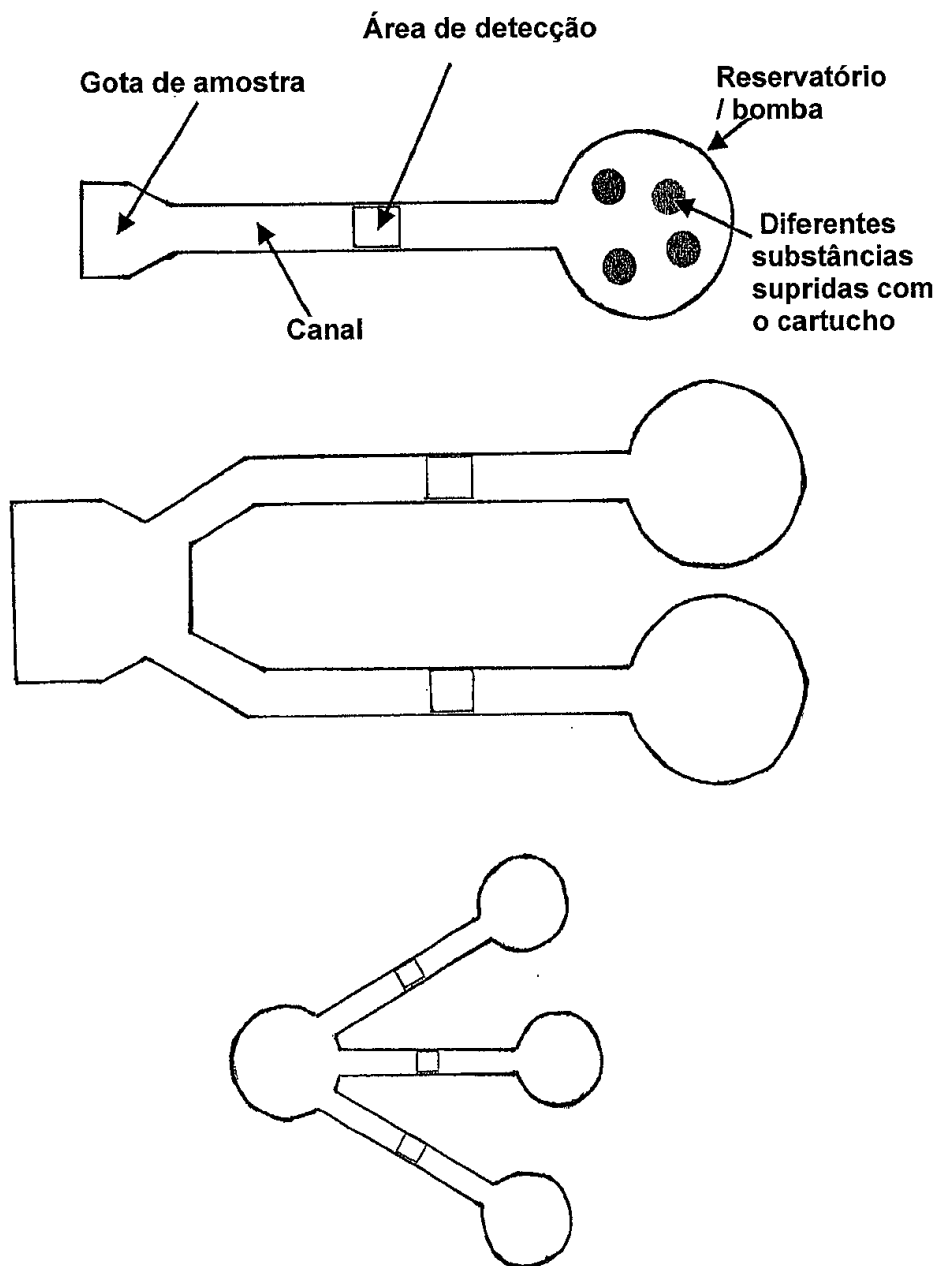


FIG. 4b

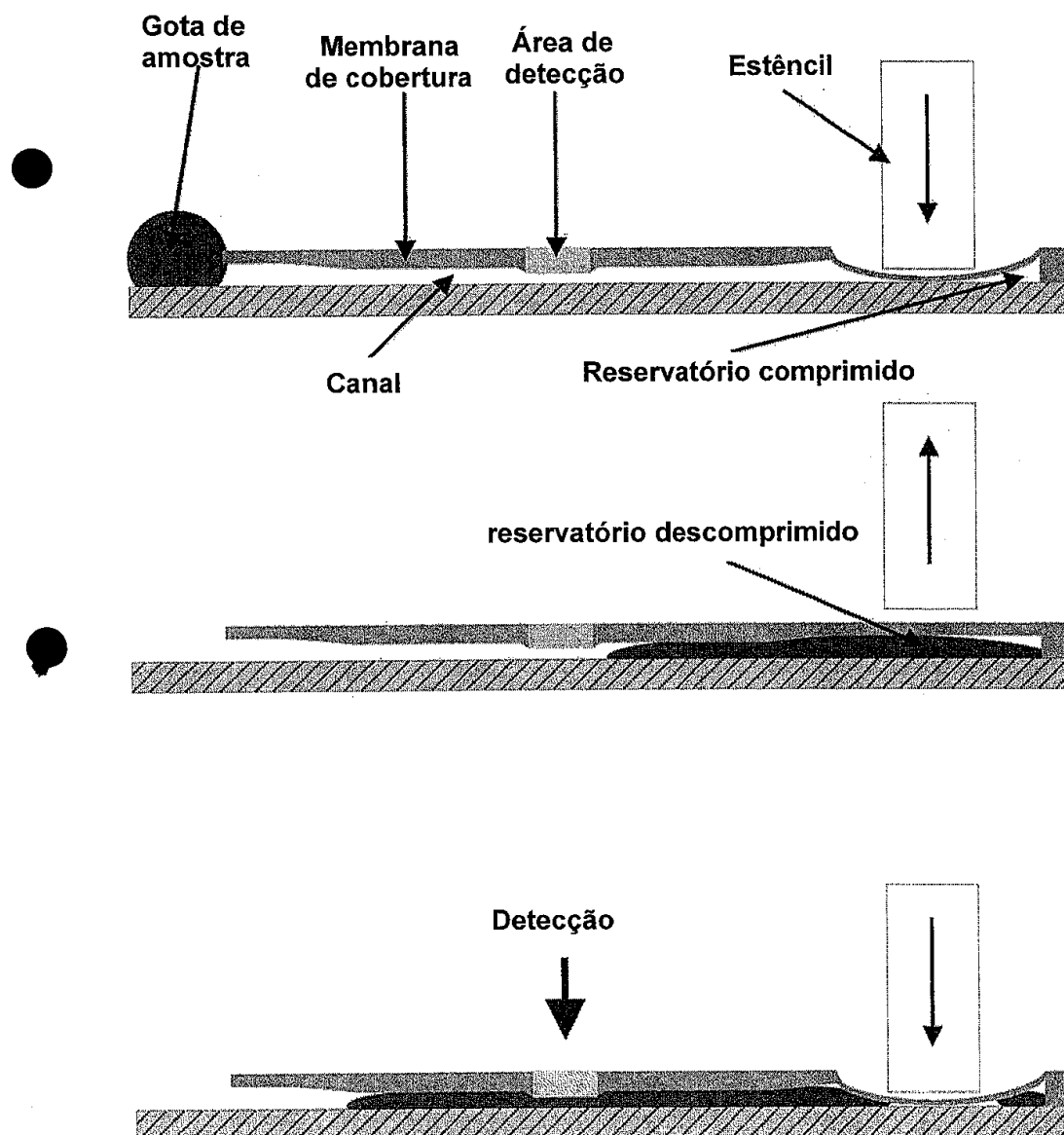


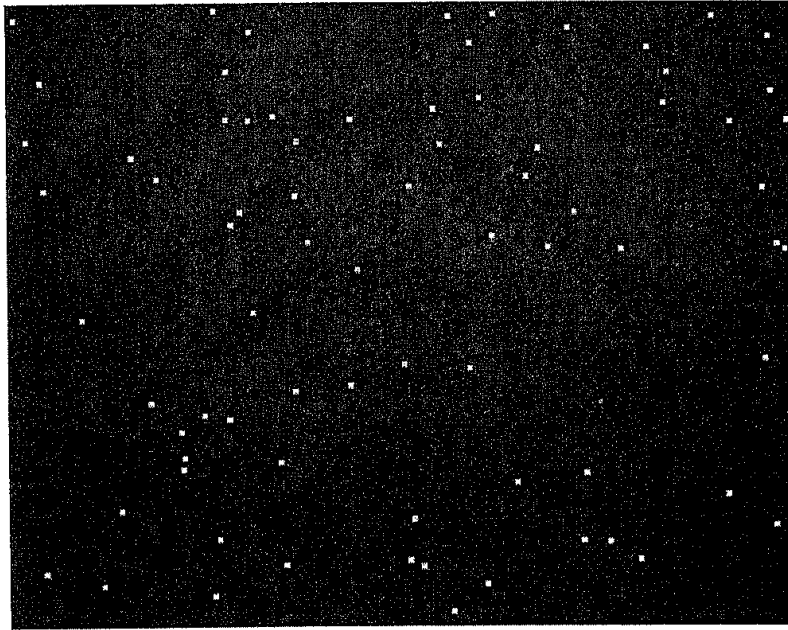
FIG. 5

FIG. 6