



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

(21) **PI0708468-4 A2**

(22) Data de Depósito: 13/02/2007
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*

C12Q 1/04 2006.01
C12M 1/34 2006.01
C12Q 1/68 2006.01
C12Q 1/70 2006.01
G01N 33/53 2006.01
G01N 33/569 2006.01
G01N 33/58 2006.01
G01N 21/25 2006.01
G01N 21/27 2006.01

(54) Título: **MÉTODO DE DETECÇÃO DE PATÓGENOS UTILIZANDO MICROPÉROLAS CONJUGADAS COM MOLÉCULAS DE BIORECONHECIMENTO**

(30) Prioridade Unionista: 15/02/2006 CA 2,536,698, 19/12/2006 CA 2,571,904

(73) Titular(es): Fio Corporation

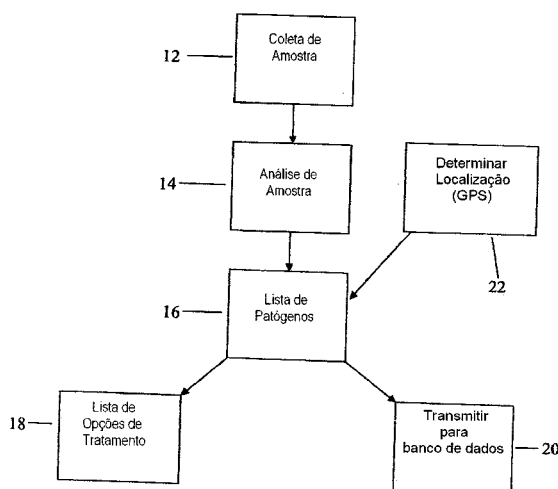
(72) Inventor(es): Kevin Charles Kain, Michael Mordinson Greenberg, Warren Che Wor Chan

(74) Procurador(es): Araripe & Associados

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007000211 de 13/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/093043de 23/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE DETECÇÃO DE PATÓGENOS UTILIZANDO MICROPÉROLAS CONJUGADAS COM MOLÉCULAS DE BIORECONHECIMENTO Um método e um sistema são fornecidos para simultânea detecção e identificação de múltiplos patógenos numa amostra de um paciente. A amostra é combinada com micropérolas que foram injetadas com grânulos quânticos ou corantes fluorescentes e conjugadas com as moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas, tais como anticorpos e oligonucleotídeos. Opções de tratamento podem ser determinadas com base nas identidades dos patógenos detectados na amostra.



**“MÉTODO DE DETECÇÃO DE PATÓGENOS UTILIZANDO
MICROPÉROLAS CONJUGADAS COM MOLÉCULAS DE
BIORECONHECIMENTO”**

A presente invenção se refere ao campo de detecção de patógenos.

5 Particularmente, se refere a um sistema e método de detecção, identificação, caracterização e controle de marcadores de patógenos e hospedeiros, coleta e disseminação de informação referente a estes patógenos e seus hospedeiros em tempo real para e a partir de um local instantâneo, fornecendo recomendações de tratamento instantâneas e informação educacional.

10 Fundamentos da Invenção

Detecção e caracterização de uma doença infecciosa é um processo complexo que idealmente começa com a identificação do agente causador (patógeno). Isto tem sido tradicionalmente acompanhado pelo exame direto e cultura de uma espécie clínica apropriada. Contudo, o exame direto é limitado pelo número de organismos
15 presentes e pela habilidade do observador em reconhecer com sucesso o patógeno. Similarmente, cultura *in vitro* do agente etiológico depende da seleção de meio de cultura adequado, assim como, das exigências do micróbio. A utilidade da cultura do patógeno é ainda restringida pelos períodos de incubação longos e limitada sensibilidade, precisão e especificidade.

20 Quando a cultura *in vitro* continua sendo uma opção viável, a identificação e a diferenciação de microorganismos tem principalmente se sustentado na morfologia microbiológica e variáveis do crescimento que, em alguns casos, são suficiente para a caracterização da cepa (isto é, perfis de isoenzimas, perfis de suscetibilidade a antibióticos, e análises quimiográficas de ácidos graxos).

25 Se a cultura é difícil, ou as espécies não são coletadas no tempo apropriado, a detecção da infecção é frequentemente realizada retrospectivamente, de algum modo, demonstrando uma resposta de anticorpos do soro no hospedeiro infectado. Métodos de detecção de antígeno e anticorpo tem se baseado nos desenvolvimento de análises de imunofluorescência direta (AFD) e indireta (AFI) e técnicas baseadas em
30 imunoensaio enzimático (IEE), mas estes métodos também podem apresentar limitada

sensibilidade.

Estes métodos existentes têm vários problemas, Primeiro, o processo pode levar vários dias para ter resultados. No caso de patógenos transmissíveis e/ou perigosos, a confirmação do tipo de patógeno pode não ser recebida até que o hospedeiro já tenha exposto outros ou passado da possibilidade de tratamento. Segundo, o transporte das amostras aos laboratórios para crescimento da cultura aumenta o risco de erros, tais como identificação errada da amostra, ou exposição de pessoas não protegidas a uma amostra que contém um patógeno altamente transmissível. Terceiro, os testes de patógenos são limitados, baseados na lista de patógenos suspeitos fornecida pelo observador (isto é, médico), significando que patógenos não suspeitados não são testados, mas podem estar presentes.

Relacionado a este método de diagnóstico está a resposta a um surto de doença infecciosa. Se um surto é suspeitado ou detectado, a resposta existente é o método da quarentena, de centenas de anos de idade. Em casos de surtos de doenças infecciosas para os quais os tratamentos apropriados e/ou testes de investigação/diagnóstico sensíveis, específicos e rápidos estão faltando, a quarentena continua sendo o único meio de prevenção da disseminação descontrolada da doença. Quando a infecção é suspeitada, simplesmente com base em padrões epidemiológicos, ou mesmo baseado na comparação da apresentação da doença, indivíduos saudáveis ou não expostos podem ficar de quarentena junto com indivíduos infectados, elevando suas possibilidades de contrair a doença como consequência da quarentena. A disponibilidade de um teste confirmatório rápido para o patógeno em questão reduziria bastante o tempo de quarentena, e deste modo, reduziria a possibilidade de contato da doença a partir de pessoas realmente infectadas.

Embora a quarentena continue sendo um método em último caso de proteção da saúde pública, a demora em fornecer um diagnóstico correto, e subsequentemente, um tratamento adequado, ocorre diariamente em hospitais e clínicas médicas similares. O problema provém do fato de que muitas doenças possuem apresentações clínicas muito similares nos primeiros estágios da infecção, e na ausência de um meticoloso histórico paciente/viagem, como por exemplo, malária e SRA

(síndrome respiratória aguda grave), podem ser equivocadamente diagnosticadas como uma gripe comum (isto é, febre, calafrios), embora com consequências potencialmente fatais. Se houvesse disponível um teste multi-patógeno que diferenciasses doenças com apresentações similares, uma tragédia poderia ser evitada.

5 Em contraste com a dependência sobre as características morfológicas, traços genotípicos e protêmicos do patógeno geralmente fornecem informações confiáveis e quantificáveis para a detecção e caracterização dos agentes infecciosos. Além disso, DENA/RNA microbiano pode ser extraído diretamente das espécies clínicas sem a necessidade de purificação ou isolamento do agente.

10 Numa escala global, técnicas moleculares podem ser amplamente aplicadas em estudos de investigação e controle que monitoram a predominância e distribuição da doença, avaliação das medidas de controle, e identificação de surtos.

Dispositivos de diagnóstico de ponto de cuidado (PDDs - "Point-of-care Diagnostic Devices") têm sido desenvolvidos para várias doenças infecciosas individuais.

15 Na maioria dos casos estes ensaios são testes imunocromatográficos únicos colorimétricos em tiras projetadas para detectar um agente infeccioso único (tanto de resposta de antígeno patógeno específico quanto de anticorpo) em um pequeno volume de sangue ou soro.

Atualmente, nenhum destes ensaios tem a capacidade de detectar múltiplos patógenos ou de simultaneamente detectar marcadores genômicos e protêmicos de múltiplos patógenos. Limitações similares existem para outros ensaios de diagnóstico rápido. Uma vez que a maioria destes testes se baseiam numa mudança colorimétrica visual única para sua leitura, as oportunidades de detectar múltiplos patógenos são gravemente impedidas e a maioria dos PDDs atuais estão restritos a detecção de um único patógeno.

25 Conseqüentemente, a avaliação de pacientes quanto a potenciais agentes infecciosos ou testes de uma unidade de sangue para agentes transmissíveis comuns requerem que múltiplos testes consecutivos de ponto de cuidado sejam realizados, complicando a administração clínica, retardando os resultados e elevando os custos significativamente.

Muitos PDDs não atendem ao que é considerado requerimentos essenciais

30 incluindo: facilidade de realização, requerimento de treinamento mínimo, geração de

resultados inambíguos, alta sensibilidade e especificidade, geração de resultados no mesmo dia (preferencialmente em minutos), relativo baixo custo e nenhuma necessidade de refrigeração ou equipamento adicional especializado.

Em resumo, apesar da disponibilidade atual de excelentes reagentes para diagnóstico (por exemplo, marcadores de anticorpo e ácidos nucleicos) que reconhecem alvos em muitos patógenos microbianos, as estratégias atuais apresentam características inadequadas de desempenho. Contribuindo para isto está o fato de que estes reagentes são conjugados com corantes orgânicos, partículas ou enzimas marcadas com ouro aos quais falta suficiente sensibilidade para serem detectados no nível molecular simples. Além disso, os atuais esquemas de detecção e plataformas PDD tipicamente se baseiam em mudanças únicas colorimétricas macroscópicas e não são bem estudadas quanto a detecção simultânea de múltiplos patógenos.

Avanços mais recentes em diagnóstico molecular, incluindo PCR em tempo real combinado com processamento automático de espécies, têm endereçado um número de limitações aos recentes ensaios de amplificação de gene não-padronizada e *in situ*. Estes ensaios representam um significativo avanço na detecção, quantificação e caracterização de muitos micróbios e atualmente representam o “ouro” ou o padrão de referência para diagnósticos de doenças infecciosas para inúmeros patógenos. Contudo, estes ensaios são ainda complexos, caros, e requerem equipamento especializado, criando várias barreiras às suas potenciais aplicações como ponto de cuidado.

Finalmente, as atuais estratégias de detecção genômica ou proteômica requerem um processamento da amostra e comprometimento técnico para uma estratégia ou outra. Não há atualmente capacidade de detectar simultaneamente tanto alvos antigênicos para alguns patógenos e alvos genéticos para outros. Isto limita a detecção simultânea de alvos patógenos-específicos preferidos e apresenta uma barreira a exploração completa da força complementar de ambas estratégias.

Necessita-se de um sistema que possibilite a detecção, identificação e caracterização de patógeno, bem como, caracterização de hospedeiro de uma maneira muito mais oportuna do que os métodos existentes. Preferivelmente, tal sistema sustentaria uma plataforma de seleção modular de patógeno, baseado nas necessidades específicas de

cuidados médicos ou clínicos no contexto em que o dispositivo é usado (isto é, para investigação ou diagnóstico). Além disso, o sistema também seria capaz de detecção, identificação e caracterização simultânea de múltiplos patógenos numa única amostra em que os patógenos são diferenciados pelos perfis óticos patógeno-específicos armazenados numa base de dados pré-existente.

Resumo da Invenção

De acordo com um aspecto da invenção é provido um método de realização de um ou mais de: detecção, identificação e caracterização de patógenos e caracterização de hospedeiros de patógenos utilizando marcadores para patógenos e hospedeiros, compreendendo as etapas de: a) preparar um meio de detecção-marcador contendo assinaturas da identidade e características de patógenos e opcionalmente de hospedeiros; b) coleta de uma amostra de um hospedeiro; c) combinação de amostra com marcador-meio de detecção e d) análise de assinaturas para detectar, identificar e caracterizar os patógenos, e opcionalmente, caracterizar o hospedeiro.

Preferivelmente, a amostra coletada é uma amostra de sangue, embora plasma, soro, líquido céfalo-raquidiano (LCR), lavagem bronquialveolar (LBA), secreção nasofaríngea (NF) coletada, aspirados de NF, expectoração e outros tipos de amostras também podem ser usadas, e os marcadores do sistema de detecção é patógeno-meio de detecção que preferivelmente compreendem micropérolas conjugadas com moléculas de bioreconhecimento (MBRs) e as micropérolas são injetadas como grânulos quânticos, ou uma partícula ou composto fluorescente. Também preferivelmente, cada uma das micropérolas contém uma combinação única de grânulos quânticos para fornecer um código de barras ótico único associado a cada micropérola para detecção patógeno-específica única e/ou assinaturas de hospedeiros específicos.

Preferivelmente, a etapa de análise compreende iluminar a amostra de micropérola-patógeno com um laser conforme esta flui através de um canal microfluídico e coleta do espectro resultante com um espectrofotômetro/câmera CCD, tubo fotomultiplicador e/ou uma coleção de fotodetectores em avalanche (FDAs). Cada espectro se correlaciona a um patógeno previamente designado.

Opcionalmente, o método pode incluir a produção de uma lista de

marcadores de caracterização de hospedeiros associados com a dita amostra do hospedeiro como parte da etapa de análise d).

Opcionalmente, o método pode incluir uma etapa adicional e) de fornecimento de uma lista de opções de tratamento com base na lista de patógenos gerada pela etapa de análise d).

Opcionalmente, o método pode também incluir a etapa f) de correlação de dados de informação de localização geográfica com a lista de patógenos e marcadores de hospedeiros gerada na etapa de análise d) via um localizador GPS.

Preferivelmente, o método ainda inclui uma etapa adicional g) de transmissão, preferivelmente sem fio, da dita lista de marcadores de patógenos e a dita lista de marcadores identificadores de hospedeiros e os ditos dados de localização geográfica para uma base de dados remota, bem como, transmissão da informação de tratamento e educacional a partir da base de dados para o dispositivo arquivado. Notar-se-á que as etapas do processo não são necessariamente conduzidas na ordem especificada.

O método ainda inclui a detecção de micropérolas-patógeno conjugadas em uma vazão de fluxo impulsionado por um fluxo eletrocinético ou hidrodinâmico através de um canal microfluídico. Conforme as pérolas com código de barras passam por um feixe de laser numa extremidade do canal, os espectros emitidos por grânulos quânticos dentro das pérolas, (como parte do código de barras), ou fora das pérolas (como parte de um mecanismo de detecção complexo pérola-patógeno, que pode incluir fluoróforos como abaixo descritos) são coletados por um sistema espectrofotômetro/câmera CCD, tubo fotomultiplicador e/ou uma coleção de FDAs e analisados por software apropriado.

De acordo com um outro aspecto da invenção um sistema de componentes é provido que é capaz de executar qualquer dos métodos acima.

As vantagens da presente invenção incluem uma vasta redução na quantidade de tempo necessária para identificar os patógenos em uma amostra de um paciente, comparado com a maioria dos métodos atualmente em uso, bem como, a habilidade em fornecer rápida informação no local referente ao tratamento e medidas de quarentena para qualquer patógeno identificado. Uma outra vantagem é a habilidade em coletar dados do paciente e patógeno numa base de dados global e extrair a informação

contida nesta base de dados para produzir perspectivas e rastreamento para vários patógenos e seus hospedeiros, cuja informação pode ser usada para controle, pesquisa, projeto terapêutico, e outros objetivos.

5 Outras vantagens e características da invenção ficarão aparentes para aqueles versados na arte a partir da seguinte descrição detalhada desta, tomada em conjunto com os desenhos anexos.

Breve Descrição dos Desenhos

A invenção será agora descrita em maiores detalhes, por meio de exemplo apenas, com referência aos desenhos anexos, em que os mesmos números se referem aos
10 mesmos elementos, em que:

A figura 1 é um fluxograma detalhando as séries de etapas no método inventivo aqui revelado;

A figura 2 é um diagrama em bloco de um dispositivo de detecção de patógeno; e

15 A figura 3 é um diagrama em bloco de dispositivos múltiplos de comunicação com uma base de dados central.

Descrição Detalhada das Realizações Preferidas

Em referência agora a figura 1, o presente método inventivo é descrito por uma série de etapas estabelecidas num fluxograma.

20 A primeira etapa 12 é coletar uma amostra de um hospedeiro (por exemplo, amostra humana, animal, ambiental), preferivelmente uma amostra de sangue, embora amostras de plasma, soro, LCR, LBA, secreção NF coletada, aspirados de NF, expectoração e outros tipos de amostras físicas podem ser usadas, conforme apropriado. Esta amostra é então analisada 14 e uma lista de patógenos identificados na amostra é
25 gerada 16. Um receptor GPS 22 determina o local do leitor de amostras e assim, a amostra. A lista de patógenos identificados e a informação de localização são ambas enviadas 20 para uma base de dados central para armazenamento e processamento. Enquanto isso, uma lista de opções de tratamento é mostrada em 18, com base nos patógenos identificados, para a consideração do operador.

30 A análise 14 é realizada por um dispositivo de detecção de patógeno 30

como mostrado na figura 2. Este dispositivo 30 é portátil, preferivelmente segurado com a mão, e possui uma saída 32 para receber uma amostra e um visor 36 para mostrar a lista de patógenos detectados dentro da amostra. Um dispositivo de entrada 38, tal como um teclado, é também provido para possibilitar o rolamento e a visualização do visor e entrada de informação adicional (notas de campo, etc.). Os patógenos numa amostra são identificados com base na identificação dos espectros com dados previamente armazenados correspondentes a cada patógeno trazido pelo dispositivo. A base de dados de espectros pode ser uma base de dados interna no dispositivo 30 (mantida numa memória flash ou armazenamento similar para permitir sua atualização) ou recuperação por comunicação com uma base de dados externa. Um receptor GPS 35 é também preferivelmente localizado no dispositivo 30, junto com um visor que mostra as coordenadas GPS. Idealmente, toda comunicação é conduzida sem fio para uma faixa máxima e portabilidade. O dispositivo de detecção de patógeno 30 é idealmente capaz de detectar múltiplos patógenos, múltiplos MBRs do mesmo patógeno, bem como, marcadores de hospedeiros dentro de uma única amostra, e preferivelmente marcadores de diferentes tipos, tais como marcadores a base de proteína e marcadores a base de genes.

O método de detecção usado pode ser variado entre os métodos disponíveis adequados, contudo, um método preferido é o uso de moléculas de bioreconhecimento (MBRs) conjugadas com micropérolas dopadas com grânulos quânticos ou nanopérolas/nanopartículas. Alternativas incluem grânulos quânticos únicos ou fluoróforos conjugados com MBRs. Grânulos quânticos, também conhecidos como nanocristais semicondutores, são partículas eletromagneticamente ativas com base na nanotecnologia, na faixa de tamanho de 2 nanômetros (nm) a 8 (nm). Uma propriedade particularmente útil dos grânulos quânticos é que estes são fluorescentes, isto é, emitem luz após breve iluminação com um laser. Adicionalmente, grânulos quânticos de diferentes tamanhos fluorescerão em diferentes cores e a cor de fluorescência pode ser modificada pela forma, tamanho e composição da partícula. MBRs são moléculas que se ligam apenas a uma única outra molécula biológica e são patógenas específicas. Por exemplo, “anticorpos” são MBRs que se ligam a proteínas e “marcadores de oligonucleotídeos” são MBRs que se ligam a sequências de genes complementares (por

exemplo, DNA ou RNA). Patógenos e hospedeiros tem tanto marcadores únicos quanto compartilhados de gene e proteína, e cada marcador pode ser ligado a uma MBR específica.

Uma micropérola, que é uma pérola de poliestireno (ou polímero similar) que pode ter de 100 nanômetros-10 micrômetros de diâmetro e dopada com uma coleção de grânulos quânticos, é fisicamente conjugada a uma MBR. Pela introdução de combinações únicas de grânulos quânticos de diferentes tamanhos (isto é, cores) e em diferentes concentrações nas micropérolas, as micropérolas com milhares de combinações distintas de cores e intensidades de grânulos quânticos podem ser criadas. Quando um laser ilumina as micropérolas, os grânulos quânticos fluorescem para produzir uma combinação distinta de cores. Estas combinações de cores são um exemplo de um código de barra, neste caso um código de barra ótico, análogo a um símbolo UPC, e tipos conhecidos similares de códigos de barra impressos. Uma vez que cada MBR reconhece um patógeno distinto ou marcador de hospedeiro e cada micropérola apresenta um código de barras único, cada micropérola MBR-conjugada fornece um código de barras para um patógeno específico ou marcador de hospedeiro reconhecido por sua MBR. Estas micropérolas MBR-conjugadas, bem como, grânulos quânticos MBR-conjugados, podem ser liofilizadas em um póe providos no kit de análise de amostra.

Para diferenciar entre pérolas MBR-conjugadas ligadas a patógenos e aquelas que não são, um sinal de detecção confirmatório adicional na forma de molécula de IgG anti-humano, e/ou um IgM anti-humano, ou um anticorpo patógeno-específico (isto é, anticorpo anti-X), ou um oligonucleotídeo (complementar a um gene de um patógeno de interesse) conjugado a um fluoróforo, é incluído. A leitura de um teste de detecção de patógeno com sucesso compreende o sinal do código de barras da pérola e um segundo sinal gerado pelo fluoróforo.

Um exemplo de detecção de patógeno é um sistema de captura de antígeno. O sistema de captura de antígeno inclui um anticorpo de captura (isto é, um MBR) que está ligado a micropérola com código de barras que é responsável pela captura do antígeno na amostra. Um segundo anticorpo (anticorpo de detecção) que reconhece o patógeno antígeno/proteína então se liga ao complexo. Este anticorpo de detecção é

conjugado com um fluoróforo. Quando a amostra é analisada, se o sinal para a detecção do anticorpo não é detectado, o patógeno não registra como detectado, tanto porque não está presente na amostra quanto por conta de falha do ensaio. O último caso é eliminado se os sinais corretos da amostra de controle positivo, isto é, detecção do código de barras apropriado da micropérola contendo MBR-grânulo quando corrido em paralelo com todos os testes clínicos forem detectados.

Um outro exemplo de detecção de patógeno é um sistema de captura de anticorpo. No sistema de captura de anticorpo, a MBR que está ligada a micropérola codificada com o código de barras é uma proteína ou antígeno patógeno-específico (natural, recombinante, ou sintético). O anticorpo complementar ao antígeno, se presente na amostra clínica se ligaria ao antígeno ligado a pérola. Este complexo é reconhecido pela adição de um anticorpo anti-humano (de detecção) secundário (IgM anti-humano ou IgG anti-humano). Este anticorpo de detecção é conjugado com um fluoróforo. Novamente, quando a amostra é analisada, se o sinal para o anticorpo de detecção não é detectado paralelamente ao sinal do código de barras da pérola o patógeno não registra como detectado, tanto porque não está presente na amostra quanto por conta de falha do ensaio. O último caso é eliminado se os sinais esperados da amostra de controle positivo, como acima mencionado, for corretamente detectados.

Ainda um outro exemplo de detecção de patógeno é um sistema de análise genômica. No sistema de análise genômica a MBR que é ligada a micropérola com código de barras é um oligonucleotídeo patógeno-específico (RNA ou DNA) (1-25 pares de base de comprimento). Com a adição da amostra, o oligonucleotídeo hibridizará com sua sequência complementar no gene do patógeno. Uma segunda sequência oligonucleotídica complementar a uma porção adjacente do gene de interesse é subsequentemente conjugada a um fluoróforo. Novamente, quando a amostra é analisada, se o sinal para a segunda sequência não é detectado, o patógeno não registra como detectado, tanto porque não está presente na amostra quanto por conta de falha do ensaio. Uma amostra de controle positivo corretamente detectada, como referida acima elimina o cenário anterior.

A amostra biológica (por exemplo, sangue) é adicionada a um recipiente, e diferentes marcadores de patógenos se ligam a várias micropérolas carregando as MRBs

de patógeno específicas. A amostra combinada é então lavada ou de outro modo tratada para remover material estranho e micropérolas não ligadas. Os anticorpos de detecção conjugados aos fluoróforos são então adicionados para produzir um complexo pérola-amostra-detector.

5 O complexo pérola-amostra-detector secundário é passado através de um canal microfluídico via um fluxo impulsionado hidrodinamicamente ou eletrocineticamente e passado através de um feixe de laser localizado em uma extremidade do canal. O feixe de laser ilumina os grânulos quânticos no complexo e os comprimentos de onda emitidos são guiados tanto para um sistema espectrofotômetro/CCD, tubo
10 fotomultiplicador e/ou uma série de FDAs. O software de deconvolução de sinal traduz o sinal e o código óptico correspondente é comparado com espectros patógeno-específicos armazenados numa base de dados de características de patógenos ou hospedeiros trazido pelo dispositivo de detecção. Então, uma lista de patógenos detectados e características de patógenos e hospedeiros é produzida. O tempo de resposta desde da obtenção da amostra
15 biológica original até a produção da lista de patógenos pode ser medido em minutos.

Idealmente, o dispositivo de detecção de patógeno 30 é um dispositivo portátil, segurado com a mão com um laser integrado e espectrofotômetro, tubo fotomultiplicador e/ou séries de unidades COLEÇÃO DE FOTODETECTORES EM AVALANCHE (FDAS), chips de canal microfluídico PDMS especificamente projetados,
20 um suprimento de pérolas com códigos de barras conjugadas com MBRs para identificação de vários patógenos, bem como, marcadores de detecção adequados do complexo pérola-patógeno (grânulos quânticos, fluoróforo, pequenas pérolas com anticorpos IgG/IgM/anti-patógeno ou oligonucleotídeos conjugados). O dispositivo 30 pode armazenar uma base de dados de identidade de patógenos na placa, ou acessar uma base de dados remota, uma
25 base de dados central. Se uma base de dados na placa ("on board") é usada, um sistema de comunicação 34 para fazer contato e receber atualizações com uma base de dados central, maior é provido.

O dispositivo de detecção de patógenos 30 pode incluir um dispositivo de rastreamento GPS que transmite a informação geográfica específica, preferencialmente
30 sem fio, a uma base de dados central.

Uma vez que a lista de patógeno é produzida, o dispositivo de detecção de patógeno 30 pode adicionalmente fornecer mais informação de valor para o diagnóstico médico. Idealmente, um protocolo de tratamento é fornecido (etapa 18), incluindo quaisquer medidas especiais necessárias para permitir comunicação do patógeno. Outras

5 informações, tais como patofisiologia, histórico da doença e referências bibliográficas podem ser providas, permitindo que o dispositivo de detecção de patógeno 30 também seja usado como uma ferramenta educacional nos cenários apropriados.

Um cenário de surto para uso do dispositivo numa detecção padrão de patógeno se estabelece da seguinte forma: Um aeroporto é um ponto de entrada que

10 representa um dos principais vetores de transporte de patógenos, bem como, apresenta problemas quanto a implementação da detecção tradicional e métodos de quarentena. Equipando-se uma equipe médica com um número de dispositivos de detecção de patógenos como aqui descritos, e um suprimento de recipientes com amostras de micropérolas capazes de detectar patógenos tipicamente transmitidos por viajantes,

15 passageiros entrando podem ser processados no local pela obtenção de uma amostra de sangue e injeção desta em um recipiente de amostra. A análise é realizada pelo dispositivo de detecção de patógeno dentro de minutos e os passageiros analisados podem ser rapidamente liberados ou redirecionados para tratamento e observação, se necessário. Enquanto um único dispositivo está limitado quanto a sua capacidade de processamento, a

20 habilidade em prover múltiplos dispositivos idênticos podem possibilitar o processamento de passageiros em questão de horas, não dias. Processamentos mais rápidos permitem que medidas adequadas de tratamento e quarentena sejam tomadas rapidamente, e sejam mais efetivas, reduzindo a probabilidade da disseminação do patógeno não verificado.

Como exemplo, um dispositivo de detecção de patógeno pode conter

25 micropérolas codificadas com códigos de barras MBR-conjugadas para detecção de três patógenos diferentes, ditos, HIV, Hepatite B e Hepatite C. As micropérolas associadas com cada patógeno apresenta um código de barras separadamente identificável, por exemplo, HIV pode apresentar pérolas vermelhas (por exemplo, detecção pelo anticorpo gp41 como indicador de infecção HIV), Hepatite B por pérolas amarelas (por exemplo,

30 detecção pelo anticorpo NSP4 como indicador de infecção de Hepatite B), e Hepatite C

por pérolas vermelhas-amareladas (por exemplo, detecção pelo anticorpo anti-NSP₄ como indicador de infecção de Hepatite C), e preferivelmente todos os marcadores de detecção utilizando o complexo marcador-patógeno laranja ou qualquer cor-marcador que seja espectralmente diferente da cor dos códigos de barra. Assim, o sistema de detecção pode prontamente identificar qualquer patógeno detectado simplesmente pelo comprimento de onda (que identifica a cor) ou intensidade dos espectros da pérola.

A partir deste modelo, o sistema pode prontamente ser expandido, por exemplo, para cinco patógenos, adicionando, por exemplo, as micropérolas de detecção de patógeno para o vírus da malária e da dengue. A partir disto, a extrapolação para mais patógenos (10, 20, 100) é principalmente limitada pela habilidade em criar um número suficiente de códigos de barras, que é baseado principalmente na dopagem das micropérolas e limites do mecanismo de detecção. Conforme o número aumenta, os códigos de barras podem ser baseados nos níveis de intensidade, bem como, nos comprimentos de onda.

A detecção e fornecimento de um protocolo de tratamento para um patógeno representa simplesmente a primeira etapa de um processo potencialmente muito mais amplo para rastreamento e controle da disseminação de patógenos como mostrado na figura 3. Projetando-se o dispositivo para ser modular e ser capaz de detectar tanto um sistema de patógenos (isto é MBRs para múltiplos patógenos) com apresentações clínicas semelhantes, atuam como uma ferramenta de investigação (por exemplo, para identificar indivíduos vacinados contra doenças selecionadas) ou permitindo que médicos ou clínicos selecionem os patógenos de interesse em suas comunidades em particular, permite uma flexibilidade de diagnóstico sem precedentes de cabeceira. A incorporação de múltiplas MBRs para o mesmo patógeno aumenta a precisão da detecção e supera as limitações associadas ao uso de MBRs únicas para detecção de patógeno (isto é, mutações e diferenças de cepas que podem resultar em falso negativo ou falso positivo). Os dados dos resultados do teste junto com os dados de localização geográfica (mas, nenhuma outra informação sobre o paciente, por exemplo, nome, endereço e outros dados para proteção de privacidade) providos pela unidade de GPS são transmitidos para uma base de dados central 40. A informação é preferivelmente enviado por meio sem fio, e imediatamente à

geração da lista de patógenos (etapa 20). A base de dados central 40 fica em contato com um número substancial de dispositivos de detecção de patógeno 30 a qualquer dado momento.

- 5 A base de dados central 40 pode estar localizada, nacional ou globalmente, ou uma combinação de diferentes bases de dados desses tipos. Idealmente, uma base de dados central de nível superior 40 é provida, a qual recebe informações constantemente de todos os dispositivos 30 espalhados pelo mundo. Ao longo do tempo, a base de dados se tornará um repositório de informações sobre todos os patógenos inseridos na plataforma de detecção emprestada a si própria para extrair, entre outros, a frequência e as
- 10 características globais de detecção de patógenos, perspectivas de patógenos a longo prazo (isto é, colonização de novos territórios), e correlações entre marcadores de patógenos e hospedeiros que podem indicar uma aumentada suscetibilidade ou resistência a doença.



PI0708468-4

1/6

REIVINDICAÇÕES

1. Método de realização de uma ou mais: detecção de patógenos, identificação de patógenos, caracterização de patógenos ou caracterização de hospedeiros de patógenos, **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:
 - 5 preparar um meio de detecção de patógeno por detecção de marcadores de patógeno e hospedeiro;
coletar uma amostra de um hospedeiro;
combinar a dita amostra com o dito meio de detecção de patógeno contendo detectores patógeno específicos; e
 - 10 analisar a dita amostra combinada para produzir uma lista de patógenos contidos dentro do hospedeiro, e uma lista de características de patógenos e hospedeiro.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por ainda incluir coletar informações sobre a localização de um ou mais: do dito patógeno e do dito hospedeiro.
- 15 3. Método de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelas ditas informações sobre localização ser coletada via um dispositivo GPS-conectado.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pela dita amostra coletada na dita etapa de coleta ser uma amostra de: sangue, plasma, LCR, soro, BAL, secreção NF coletada, aspirados de NF, ou expectoração.
- 20 5. Método de acordo com as reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo dito meio de detecção de patógeno compreender micropérolas conjugadas com moléculas de bio-reconhecimento patógeno específicas (MBRs) e as ditas micropérolas conterem: grânulos quânticos, corantes fluorescentes, ou uma combinação destes.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** por cada uma das
25 ditas micropérolas conter uma combinação única de grânulos quânticos, baseada na cor e intensidade dos ditos grânulos quânticos, para fornecer uma código de barras óptico único associado a cada dita combinação de detecção micropérola-patógeno.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** por cada micropérola com código de barras conjugada com seu patógeno apropriado estar ainda conjugado a
30 uma molécula de detecção e o complexo resultante da combinação ser detectado por um

segundo sinal da dita molécula de detecção para gerar uma assinatura ótica de detecção do patógeno.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo dito segundo sinal na dita molécula de detecção ser produzida por um fluoróforo.

5 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 8, **CARACTERIZADO** pela dita molécula de detecção ser conjugada com: uma molécula IgG anti-humano, uma molécula IgM anti-humano, um anticorpo de detecção anti-patógeno, ou uma sequência oligonucleotídica.

10 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **CARACTERIZADO** pela dita etapa de análise compreender iluminar o dito complexo pérola-patógeno-sinal de detecção com um laser, analisar um espectro resultante e identificar o patógeno a partir de uma base de dados.

15 11. Método de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pela dita etapa de análise ser realizada por: um espectrofotômetro/câmera CCD combinados, um tubo fotomultiplicador, uma coleção de fotodetectores em avalanche ou uma combinação destes.

20 12. Método de acordo com as reivindicações 9-11, **CARACTERIZADO** pela dita etapa de análise compreender passar o complexo da amostra através de um canal microfluídico sob a influência de forças de fluxo, através de um feixe de laser e capturar um espectro resultante.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo dito canal microfluídico compreender um canal de PDMS fundido que é tratado com plasma, e fixado numa lâmina de vidro.

25 14. Método de acordo com as reivindicações 12 ou 13, **CARACTERIZADO** pelas ditas forças de fluxo serem tanto forças eletrocinéticas ou hidrodinâmicas.

15. Método de acordo com as reivindicações 9 a 14, **CARACTERIZADO** pela dita identificação do patógeno ser conseguida via associação do espectro resultante da amostra com uma coleção de espectros patógeno-específicos de uma base de dados.

30 16. Método de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pela dita base de dados estar localizada na placa do dispositivo GPS-conectado.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pela dita base de dados estar distante e ser acessada de modo sem fio.

18. Método de acordo com as reivindicações 1 a 17, **CARACTERIZADO** por ainda incluir produzir uma lista de marcadores característicos de hospedeiros associados à amostra a partir do hospedeiro como parte da dita etapa de análise.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **CARACTERIZADO** por ainda incluir uma etapa adicional de fornecimento de uma lista de opções de tratamento com base na lista de patógenos gerada na etapa de análise.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **CARACTERIZADO** por ainda incluir uma etapa adicional de transmissão da dita lista de patógenos e características de patógenos e a dita lista das características do hospedeiro para uma base de dados remota.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **CARACTERIZADO** pelo meio de detecção de patógeno incluir detectores para pelo menos três patógenos específicos, predeterminados.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **CARACTERIZADO** pelo meio de detecção de patógeno incluir detectores para HIV, hepatite B e hepatite C.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **CARACTERIZADO** pelo meio de detecção de patógeno incluir detectores para HIV, hepatite B, hepatite C, malária e vírus da dengue.

24. Sistema para um ou mais: detecção de patógenos, identificação de patógenos, caracterização de patógenos ou caracterização de hospedeiros de patógenos, **CARACTERIZADO** por compreender:

a) um meio de amostra contendo moléculas de bio-reconhecimento patógeno específicas (MBRs) a ser combinado com uma amostra de hospedeiro; e

b) um dispositivo de detecção de patógeno para analisar o dito meio da amostra e gerar uma lista de patógenos e características de patógenos e hospedeiros detectados dentro do dito meio da amostra.

25. Sistema de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** por ainda incluir uma base de dados que contém informação sobre diferentes patógenos e uma conexão no

dito dispositivo de detecção de patógeno que permite comunicação com a dita base de dados.

26. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 e 25, **CARACTERIZADO** pela dita conexão à dita base de dados ser realizada por uma rede de comunicações sem fio.

27. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, **CARACTERIZADO** pelo dito meio de amostra compreender micropérolas conjugadas com moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas (MBRs) e as ditas micropérolas contendo grânulos quânticos e a dita amostra do hospedeiro ser uma amostra de: sangue, plasma, LCR, soro, BAL, secreção NF coletada, aspirados de NF, ou expectoração.

28. Sistema de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** por cada uma das ditas micropérolas conter uma combinação única de grânulos quânticos para fornecer um código de barras único, único associado a cada patógeno.

29. Sistema de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** por cada micropérola com código de barras conjugada com seu patógeno apropriado ser ainda conjugada com um complexo gerador de um segundo sinal para gerar uma assinatura única de detecção de patógeno.

30. Sistema de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo complexo gerador de um segundo sinal ser um fluoróforo.

31. Sistema de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo dito fluoróforo ser conjugado com: uma molécula IgG anti-humano, ou uma molécula IgM anti-humano, ou um anticorpo de detecção anti-patógeno, ou uma sequência oligonucleotídica.

32. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-31, **CARACTERIZADO** pelo dito dispositivo de detecção de patógeno compreender um laser para iluminar a dita amostra e um espectrofotômetro/câmera CCD combinados, um tubo fotomultiplicador, uma coleção de fotodetectores em avalanche (FDAs) ou uma combinação destes para detectar um espectro resultante.

33. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-32, **CARACTERIZADO** pelo dito dispositivo de detecção de patógeno ainda incluir meios para gerar uma lista de

opções de tratamento com base na lista de patógenos gerada.

34. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-33, **CHARACTERIZADO** pelo dito dispositivo de detecção de patógeno ainda incluir meios para gerar uma lista de marcadores de caracterização de hospedeiro associada à dita amostra de hospedeiro.

5 35. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-34, **CHARACTERIZADO** pela dita lista de patógenos e características de patógenos ser transmitida à dita base de dados.

36. Sistema de acordo com a reivindicação 35, **CHARACTERIZADO** pela transmissão à dita base de dados ocorrer automaticamente sob a geração da dita lista.

10 37. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-36, **CHARACTERIZADO** pela dita etapa de análise compreender iluminar o dito complexo pérola-patógeno-sinal de detecção com um laser e analisar um espectro resultante e identificar o patógeno a partir de uma base de dados.

15 38. Sistema de acordo com a reivindicação 37, **CHARACTERIZADO** pela análise da dita amostra envolver passar a amostra através de um canal microfluídico e através de um feixe de laser via forças de fluxo e capturar um espectro resultante.

39. Sistema de acordo com a reivindicação 38, **CHARACTERIZADO** pelo dito canal de PDMS fundido que é tratado com plasma, e fixado numa lâmina de vidro.

20 40. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 e 39, **CHARACTERIZADO** pelas ditas forças de fluxo serem tanto eletrocinéticas quanto forças hidrodinâmicas.

25 41. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 40, **CHARACTERIZADO** pelo dito espectro resultante ser direcionado via um filtro para um: espectrofotômetro, uma série de fotodetectores em avalanche (FDAs), um tubo fotomultiplicador, ou uma combinação destes.

42. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, **CHARACTERIZADO** pela dita identificação do patógeno ser conseguida via associação do espectro resultante da amostra com uma coleção de espectros patógeno-específicos da dita base de dados.

30 43. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 42,

CARACTERIZADO pela dita base de dados estar na placa do dispositivo.

44. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 42, **CARACTERIZADO** pela dita base de dados estar remotamente localizada e ser acessada de modo sem fio.

5 45. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 44, **CARACTERIZADO** pelo dispositivo ainda incluir um dispositivo localizador GPS para fornecer dados de localização associados à dita amostra.

10 46. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 45, **CARACTERIZADO** pelas ditas micropérolas MBR-conjugadas e os fluoróforos MBR-conjugados serem providos como um pólioofilizado.

47. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 46, **CARACTERIZADO** pelas ditas MBRs serem um ou mais de: patógeno nativo, recombinante ou sintético e anticorpos hospedeiro específicos ou antígenos ou oligonucleotídeos complementares ao patógeno ou genes do hospedeiro de interesse.

15 48. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 47, **CARACTERIZADO** pelas moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas incluírem MBRs para pelo menos três patógenos específicos, predeterminados.

20 49. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 48, **CARACTERIZADO** pelas moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas incluírem MBRs para HIV, hepatite B e hepatite C.

50. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 49, **CARACTERIZADO** pelas moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas incluírem MBRs para HIV, hepatite B, hepatite C, malária e vírus da dengue.

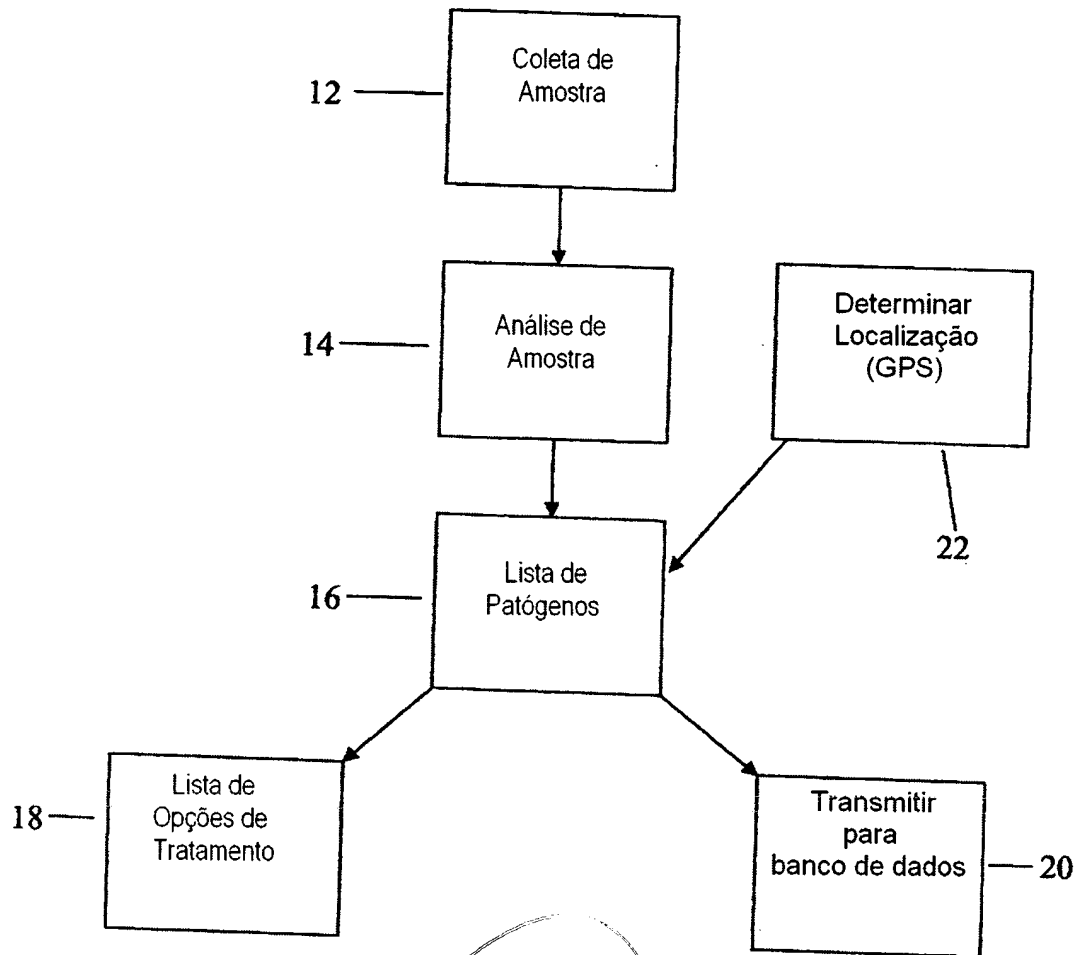


FIGURA 1

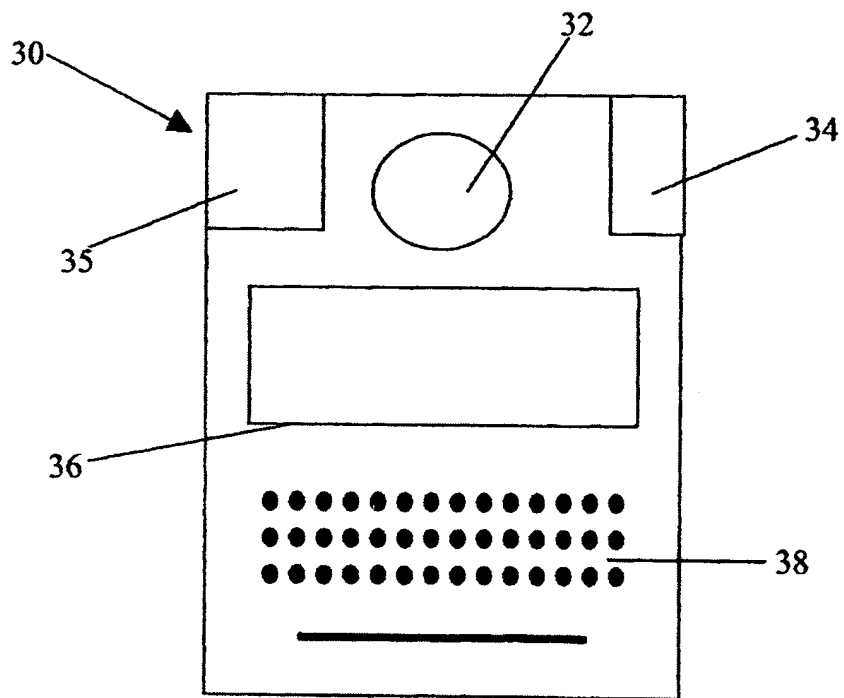


FIGURA 2

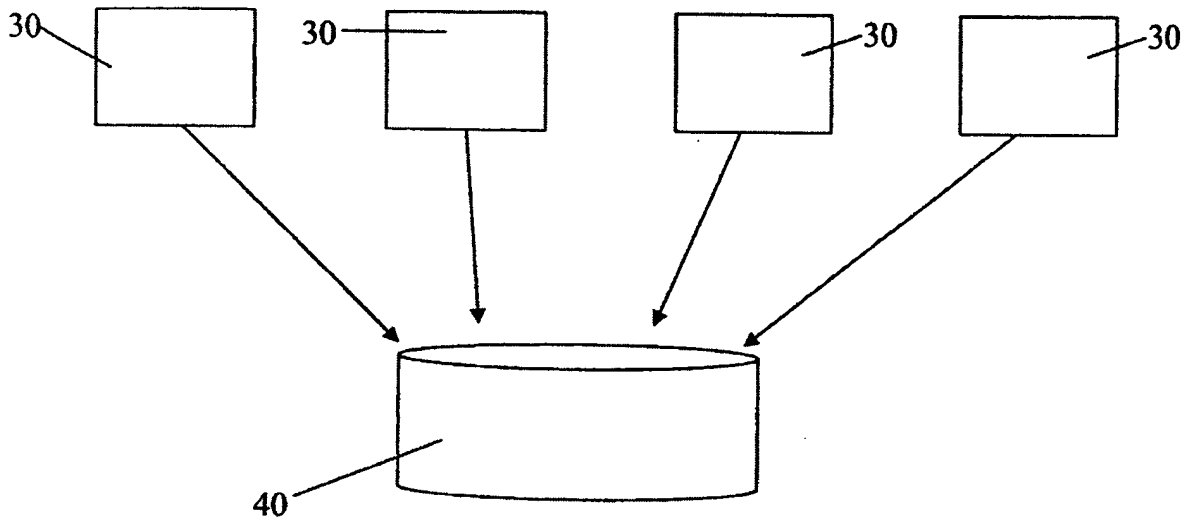


FIGURA 3

RESUMO**“MÉTODO DE DETECÇÃO DE PATÓGENOS UTILIZANDO
MICROPÉROLAS CONJUGADAS COM MOLÉCULAS DE
BIORECONHECIMENTO”**

5 Um método e um sistema são fornecidos para simultânea detecção e
identificação de múltiplos patógenos numa amostra de um paciente. A amostra é
combinada com micropérolas que foram injetadas com grânulos quânticos ou corantes
fluorescentes e conjugadas com as moléculas de bioreconhecimento patógeno específicas,
tais como anticorpos e oligonucleotídeos. Opções de tratamento podem ser determinadas
10 com base nas identidades dos patógenos detectados na amostra.