



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102012902043619
Data Deposito	20/04/2012
Data Pubblicazione	20/10/2013

Classifiche IPC

Titolo

DISPOSITIVO, METODO E KIT PER IL RILEVAMENTO DI DIFFERENTI MARKER IN DIFFERENTI TIPI CELLULARI O MOLECOLARI E LORO QUANTIFICAZIONE.
--

Dispositivo, metodo e kit per il rilevamento di differenti marker in differenti tipi cellulari o molecolari e loro quantificazione

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a:

- dispositivi in forma di micropiastre o microstrip con pozzetti allungati idonei ad accogliere 3 o 4 o 6 elementi immunoadsorbenti sporgenti da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di microstrip standard a 8 o a 12 pozzetti o di micropiastre standard a 96 pozzetti;
- al metodo che utilizza tali dispositivi ponendo in competizione due fasi solide di diversa conformazione, quali i pozzetti allungati, su ciascuno dei quali viene immobilizzato un differente tipo cellulare o molecolare presente nel campione in esame, e gli elementi immunoadsorbenti sporgenti da un'asta, che vengono immersi in ciascun pozzetto allungato in gruppi di 3 o 4 o 6, dopo che su ciascuno di tali elementi è stato immobilizzato uno degli stessi marker che si vogliono rilevare nel campione in esame e dopo che nei pozzetti allungati siano stati inoculati ligandi per i marker da rilevare, in fase liquida; tali ligandi si legano agli elementi immunoadsorbenti in quantità inversamente proporzionale alla quantità dei relativi marker espressi da ciascun tipo cellulare o molecolare immobilizzato sul relativo pozzetto allungato e sono quantificabili simultaneamente attraverso un saggio immunoenzimatico condotto immergendo l'asta recante gli elementi immunoadsorbenti in un contenitore contenente il coniugato e, successivamente, immergendo ogni singolo elemento in singoli pozzetti di microstrip o micropiastre standard contenenti substrato cromogeno, in ognuno dei quali, infine, si esegue la lettura spettrofotometrica;
- kit strutturati per l'esecuzione di detto metodo attraverso l'uso dei suddetti dispositivi a pozzetti allungati, per la quantificazione simultanea di differenti marker cellulari o molecolari e per il concomitante rilevamento delle differenti cellule o molecole che li espongono, ivi compresi kit immunoenzimatici per diagnosi rapida di tubercolosi e di paratubercolosi in stadio precoce, basata sulla quantificazione di differenti marker di infezione presenti nelle diverse popolazioni linfocitarie cooperanti e citolitiche, sensibilizzate da diversi antigeni o apteni micobatterici.

La conformazione a pozzetti allungati dei dispositivi è necessaria per l'esecuzione del metodo finalizzato ad ottenere:

1. l'immobilizzazione selettiva sulla superficie di ciascun pozzetto allungato, mediata o meno da anticorpi, di un differente tipo cellulare o molecolare del campione in esame del quale si vogliono quantificare simultaneamente differenti marker, in modo che la superficie dei pozzetti allungati acquisisca funzione di fase solida per saggi immunoenzimatici ed ELISA, divenendo idonea a catturare e immobilizzare specifici ligandi in fase liquida;

2. la successiva cattura, da parte delle cellule o molecole immobilizzate sulla superficie dei pozzetti allungati, di ligandi specifici per ciascuno dei marker da quantificare simultaneamente, che vengono inoculati nei pozzetti allungati come un mix di quantità nota in fase liquida; tali ligandi catturati dalle cellule immobilizzate sulla superficie dei pozzetti allungati non possono essere misurati direttamente attraverso saggi immunoenzimatici e ELISA a causa dell'interferenza del tappeto cellulare con la lettura spettrofotometrica della reazione cromogena finale; il problema tecnico viene risolto rilevando analiticamente la proporzionale frazione di ligandi che è stata catturata da una seconda fase solida, specificamente sensibilizzata, che viene introdotta nella prima entrando in competizione per la cattura dei ligandi in fase liquida e sulla quale i ligandi si separano, in modo da poter poi essere quantificati singolarmente con saggio immunoenzimatico e ELISA in pozzetti di microstrip e micropiastre standard; tale seconda fase solida è costituita dagli elementi immunoassorbenti sporgenti da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di microstrip standard a 8 o 12 pozzetti o di micropiastre standard a 96 pozzetti, nella quale ogni elemento è sensibilizzato con anticorpi diretti contro uno specifico ligando e compete, per la sua cattura, con uno dei marker da quantificare nel campione in esame;

3. la quantificazione di ciascun ligando catturato separatamente dagli elementi immunoassorbenti, realizzata attraverso saggio immunoenzimatico o ELISA, che prevede l'incubazione degli elementi sporgenti dall'asta in coniugato e, successivamente, in substrato cromogeno distribuito in singoli pozzetti di microstrip o micropiastre standard, in modo tale che il risultato analitico sia espresso come densità ottica rilevata mediante lettura spettrofotometrica per ciascuno dei marker di interesse presente in ciascun tipo cellulare o molecolare del campione in esame; la quantità di ciascun ligando catturato dall'elemento immunoassorbente specificamente sensibilizzato è inversamente proporzionale alla quantità del rispettivo marker di ciascun tipo cellulare o molecolare presente nel campione in esame, perché rilevata con saggio competitivo nel quale due fasi solide di diversa conformazione - il pozzetto allungato e gli elementi sporgenti da un'asta - sono in competizione per la cattura degli stessi ligandi in fase liquida; tale saggio competitivo si diversifica dai saggi riscontrabili nello stato dell'arte, che pongono diverse molecole in fase liquida in competizione per il legame alla stessa fase solida e non consentono di allestire saggi per la duplice determinazione di differenti marker e di differenti cellule o molecole che li espongono; la quantificazione di ciascun ligando catturato separatamente dagli elementi immunoassorbenti può essere ottenuta con saggio immunoenzimatico o altri saggi idonei, come ad esempio la chemiluminescenza.

I dispositivi e il metodo ideati possono essere applicati alla strutturazione di kit che rilevano la risposta immunitaria cellulare attraverso un saggio immunoenzimatico che quantifica simultaneamente differenti marker linfocitari di infezione tubercolare e paratubercolare e

contemporaneamente identifica le differenti popolazioni linfocitarie cooperanti o citolitiche che li espongono, consentendo la diagnosi rapida di tubercolosi umana, di tubercolosi bovina e di paratubercolosi dei ruminanti in stadio precoce.

La presente invenzione nasce, infatti, per risolvere alcune problematiche nella diagnostica della tubercolosi dell'uomo, che è una delle malattie infettive a maggiore incidenza mondiale:

- rilevare la risposta immunitaria cellulare caratterizzata dalla comparsa di linfociti T cooperanti e di linfociti T citolitici specifici per antigeni del micobatterio tubercolare e seguirne l'evoluzione durante la malattia e la terapia, in quanto il rilevamento di anticorpi prodotti nella risposta immunitaria umorale non fornisce risultati diagnostici attendibili;
- individuare i casi di infezione polmonare, extra-polmonare e i portatori latenti di infezione attraverso un test di diagnosi indiretta basato sul rilevamento della risposta immunitaria;
- ottenere il risultato analitico in poche ore, in modo da poter trattenere i pazienti infetti e iniziare immediatamente la terapia;
- il personale addetto all'esecuzione delle analisi di laboratorio deve poter essere addestrato in tempi brevi, compatibilmente con campagne sanitarie su larga scala in Paesi in via di sviluppo, che sono a maggiore incidenza di infezione;
- non devono essere necessarie complesse e costose strutture di laboratorio, che non sono diffuse capillarmente nei Paesi in via di Sviluppo.

Tali problematiche diagnostiche corrispondono alla necessità di soluzione di problemi tecnici per la realizzazione di:

- kit in grado di rilevare e quantificare la presenza di marcatori di infezione su cellule linfocitarie di diverso tipo;
- kit idonei a rilevare lo stato dell'immunità cellulare del soggetto in esame, che è un indicatore di infezione indipendentemente dalla localizzazione del micobatterio;
- kit rapidi, come quelli ampiamente utilizzati per saggi ELISA nelle altre infezioni diagnosticabili mediante il rilevamento di anticorpi;
- kit pronti all'uso;
- kit utilizzabili da personale minimamente addestrato;
- kit utilizzabili in strutture laboratoristiche minimamente dotate.

Per soddisfare le sopra elencate esigenze e adottando come principio diagnostico quello della quantificazione simultanea di differenti marker linfocitari evidenziabili in corso di infezione tubercolare e dell'identificazione delle differenti popolazioni linfocitarie che li espongono, quali i linfociti T CD4 cooperanti e i linfociti T CD8 citotossici, i dispositivi e il metodo ideato per la loro

utilizzazione, finalizzata alla quantificazione simultanea di differenti marker cellulari e al concomitante rilevamento delle differenti cellule che li espongono, vengono applicati alla strutturazione di specifici kit diagnostici, in sintesi di seguito descritti.

Dispositivi utili alla strutturazione dei kit

Nel kit per analisi di campione singolo il dispositivo a pozzetti allungati è costituito da microstrip a 3 pozzetti allungati, ciascuno idoneo ad accogliere 4 elementi immunoassorbenti sporgenti da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti delle micropiastre standard a 96 pozzetti; esso è di materiale immunoassorbente utile all'adsorbimento di anticorpi monoclonali che catturano selettivamente linfociti T CD4 o linfociti T CD8 del campione in esame, immobilizzandoli separatamente su due dei tre pozzetti allungati, mentre il terzo non viene sensibilizzato e funge da controllo negativo.

Nel kit per analisi di 8 campioni il dispositivo a pozzetti allungati è costituito da micropiastre a 24 pozzetti allungati, contenenti 3 pozzetti allungati per ciascuna fila da A ad H; ciascun pozzetto allungato è idoneo ad accogliere 4 elementi immunoassorbenti sporgenti da un'asta e l'intero dispositivo è di materiale immunoassorbente.

Gli elementi sporgenti da un'asta sono di materiale immunoassorbente, in numero di 12, preventivamente sensibilizzati mediante immobilizzazione su ciascuno di essi di uno degli stessi marker da quantificare su ciascuno dei differenti tipi cellulari del campione in esame.

Tali elementi vengono introdotti nei pozzetti allungati che hanno catturato gli specifici linfociti e nei quali è stata aggiunta una fase liquida contenente un ligando per ciascun marker. Le due fasi solide di diversa conformazione competono con i linfociti immobilizzati sui pozzetti allungati, eventualmente essi siano sensibilizzati dall'infezione tubercolare, per la cattura di ligandi per i marker da quantificare.

Metodo

Il metodo per il rilevamento di differenti marker di infezione tubercolare in differenti popolazioni linfocitarie cooperanti e citolitiche e per la loro quantificazione prevede l'utilizzazione dei dispositivi a pozzetti allungati per l'attuazione della reazione di competizione tra due fasi solide di diversa conformazione, attraverso i seguenti passaggi:

- sulla superficie dei pozzetti allungati si legano selettivamente, grazie alla preventiva immobilizzazione di specifici agenti di cattura, i differenti linfociti T CD4 o T CD8 presenti nel campione in esame;
- in un passaggio successivo, differenti ligandi biotinilati per i marker linfocitari di infezione, da quantificare, sono aggiunti in fase liquida nei pozzetti allungati, nei quali viene immediatamente introdotta anche la seconda fase solida, costituita da elementi sporgenti da un'asta; su ciascuno

degli elementi introdotti in ciascun pozzetto allungato è immobilizzato un agente di cattura uguale a uno dei diversi marker da rilevare sui linfociti;

- i ligandi biotinilati si legano, quindi, alle rispettive punte in quantità inversamente proporzionale alla quantità di ciascun marker espresso sui linfociti di tipo T CD4 o T CD8 catturati sulla prima fase solida, costituita dal pozzetto allungato;
- in un successivo passaggio analitico, il dispositivo con elementi sporgenti da un'asta viene immerso interamente in un contenitore contenente il coniugato costituito da enzima e streptoavidina, il che offre un vantaggio economico rispetto all'uso di micropiastre o microstrip ed è possibile per il fatto che un unico tipo di coniugato costituito da enzima-streptoavidina è idoneo a rilevare la presenza dei differenti ligandi biotinilati catturati dagli elementi; la quantità di coniugato catturato da ciascun elemento è inversamente proporzionale alla quantità del rispettivo marker linfocitario del campione in esame;
- gli elementi, infine, vengono immersi singolarmente nei pozzetti di micropiastre o di microstrip standard contenenti il substrato cromogeno nei quali si sviluppa la reazione colorimetrica misurabile attraverso lettura spettrofotometrica.

Kit

I kit per diagnosi di tubercolosi basata sulla quantificazione simultanea di differenti marker d'infezione presenti sulle diverse popolazioni linfocitarie sono strutturati in modo da contenere essenzialmente:

- microstrip o micropiastre a pozzetti allungati, secondo quanto precedentemente descritto, su ciascuno dei quali è immobilizzato un agente di cattura per uno specifico tipo di linfocita da rilevare nel campione;
- aste con elementi sporgenti, ciascuno dei quali sensibilizzato con un agente di cattura uguale ad uno dei diversi marker da rilevare in ciascun tipo di linfocita del campione immobilizzato sui pozzetti allungati;
- fase liquida contenente mix a titolo noto di ligandi per i marker da quantificare sulle differenti popolazioni linfocitarie immobilizzate sui pozzetti allungati, che entrano in competizione, per la cattura di tali ligandi, con gli elementi sporgenti dall'asta; tali ligandi sono biotinilati;
- tubo contenente il coniugato perossidasi di rafano/streptoavidina, nel quale va immersa l'asta con elementi immunoadsorbenti, dopo l'incubazione nel mix di ligandi nei pozzetti allungati;
- microstrip o micropiastre con substrato cromogeno distribuito nei pozzetti ove vanno singolarmente immersi gli elementi immunoadsorbenti, nel passaggio analitico finale.

I kit in tal modo strutturati consentono di proporre una soluzione per i principali problemi diagnostici della tubercolosi umana e bovina, quali la localizzazione extra-polmonare

dell'infezione, i lunghi tempi delle procedure di laboratorio, la disponibilità di laboratori attrezzati, di apparecchiature costose e di personale esperto.

In campo veterinario, i kit così strutturati consentono una più agevole esecuzione delle operazioni di profilassi della tubercolosi bovina e rispondono alla necessità di individuare in stadio precoce i ruminanti infetti da paratubercolosi, per ridurre la diffusione dell'infezione in allevamento.

I dispositivi a pozzetti allungati ideati e il loro uso nella reazione di competizione tra due fasi solide di diversa conformazione, che consente due tipi di rilevazione multipla, quali l'identificazione dei tipi cellulari che espongono determinati marker e la determinazione quantitativa dei differenti marker di interesse, sono applicabili, *mutatis mutandis*, al rilevamento e alla quantificazione di marker cellulari e molecolari, anche anticorpali, differenziando i tipi cellulari o molecolari o le differenti classi anticorpali che li espongono e che possono essere selezionati da un campione eterogeneo, attraverso kit pronti all'uso che non necessitano di strumentazioni di laboratorio e di personale specializzato per l'esecuzione dei test.

In base alle specifiche esigenze analitiche e diagnostiche, possono essere selezionate le dimensioni e la disposizione dei pozzetti allungati che costituiscono i dispositivi ideati, secondo quanto di seguito descritto.

Le microstrip o micropiastre con pozzetti allungati hanno le dimensioni delle microstrip standard a 8 o a 12 pozzetti o delle micropiastre standard a 96 pozzetti a sezione trasversale circolare; la modifica consiste nel sovradimensionamento dei pozzetti nella direzione della lunghezza della microstrip o secondo la direzione delle file o, alternativamente, delle colonne della micropiastra, in relazione al formato desiderato, in modo che ciascuna microstrip, o ciascuna fila o ciascuna colonna di micropiastra contengano pozzetti allungati secondo una delle modalità di seguito indicate:

- 2 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozzetti circolari, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 8 pozzetti e ciascun pozzetto allungato può accogliere 4 elementi sporgenti da un'asta, sulla quale detti elementi sono disposti a distanza modulare che coincide con la disposizione modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti o di microstrip standard a 8 o a 12 pozzetti;
- 2 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 6 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 12 pozzetti e ciascun pozzetto allungato può accogliere 6 dei suddetti elementi;
- 3 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, possono essere presenti nella microstrip della dimensione

di una microstrip standard a 12 pozzetti e ciascun pozzetto allungato può accogliere 4 dei suddetti elementi;

- 4 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 3 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 12 pozzetti e ciascun pozzetto allungato può accogliere 3 dei suddetti elementi.

Nella micropiastra delle dimensioni di una micropiastra standard a 96 pozzetti possono essere presenti:

- 2 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, in ciascuna delle 12 colonne contrassegnate da 1 ad 12, per un totale di 24 pozzetti allungati, ciascuno idoneo ad accogliere 4 dei suddetti elementi;
- 2 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 6 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 16 pozzetti allungati, ciascuno idoneo ad accogliere 6 dei suddetti elementi;
- 3 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 24 pozzetti allungati, ciascuno idoneo ad accogliere 4 dei suddetti elementi;
- 4 pozzetti allungati, ciascuno corrispondente all'estensione di 3 pozzetti allineati di una micropiastra standard a 96 pozzetti, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 32 pozzetti allungati, ciascuno idoneo ad accogliere 3 dei suddetti elementi.

Il materiale costitutivo, la superficie interna e la forma del fondo dei pozzetti allungati possono essere scelte e combinate in base alle specifiche esigenze analitiche e diagnostiche, come ad esempio per la coltivazione di cellule delle quali si vuole rilevare la presenza e la quantità di determinati marcatori superficiali, o per la fissazione di cellule di sezioni sottili ottenute col microtomo da materiale congelato o da materiale incluso, per l'adsorbimento o la coltivazione o la fissazione di cellule che hanno subito infezione, per rilevare la presenza di antigeni virus-specifici o virus-indotti susseguenti all'infezione con stipiti da strada o vaccinali, per l'immunocattura di anticorpi di diverse classi anticorpali dei quali si vuole rilevare la specificità, per l'attrazione di biglie paramagnetiche rivestite di anticorpi o antigeni e che hanno legato in immunocomplesso i rispettivi bersagli molecolari o cellulari, che vengono trattenute sul fondo del pozzetto attraverso un magnete posto all'esterno.

L'elenco non è esaustivo ed è fornito ad esclusivo scopo esemplificativo.

Stato dell'arte e innovazione presentata

La diagnosi indiretta di tubercolosi, sostenuta da *Mycobacterium tuberculosis*, infezione tra quelle a maggiore incidenza nella popolazione umana a livello mondiale, non può essere

eseguita con i normali metodi sierologici e si basa sui metodi di rilevamento della risposta cellulare, quali:

- prova *in vivo* con skin test, che va letta dopo 72 ore, utile per evidenziare i casi di infezione indipendentemente dalla localizzazione del micobatterio, perché basata su una reazione di ipersensibilità ritardata di tipo IV dell'ospite infetto conseguente all'inoculazione *in vivo* di apteni del micobatterio tubercolare;
- prova in campione ematico mediante gamma-interferon test, commercialmente disponibile, che va letta dopo 18-24 ore, che evidenzia il rilascio di interleuchine, in particolare del gamma-interferon, dai linfociti TH1 cooperanti della risposta cellulo-mediata, se precedentemente sensibilizzati dall'infezione tubercolare, quando sono posti in coltura e sono stimolati dalla presenza di antigeni tubercolari.

Nell'uomo la distinzione tra tubercolosi attiva e tubercolosi latente è importante per una terapia mirata e di appropriata durata, di 9 o 6 mesi, rispettivamente, e per il monitoraggio dell'evoluzione dell'infezione in corso di terapia; essa è basata sul rilevamento del numero di linfociti TH1 - sensibilizzati nei confronti di specifici antigeni tubercolari quali ESAT-6, CFP-10, TB7.7 - che secernono gamma-interferon e altre interleuchine quando stimolati dalla presenza degli antigeni con i quali vengono posti in coltura.

Per aggirare il problema dei lunghi tempi necessari per l'esecuzione delle analisi che prevedono la coltura di linfociti, si propongono qui il rilevamento diretto e la quantificazione dei marker linfocitari che devono essere necessariamente presenti sulla membrana linfocitaria perché avvenga la stimolazione del linfocita a produrre interleuchine quando stimolato da uno specifico antigene.

La strutturazione di kit per un test rapido di screening o di diagnosi d'infezione tubercolare nell'uomo, eseguibile in poche ore e con minima attrezzatura, avrebbe grande utilità nel corso delle grandi campagne sanitarie, in caso di emergenze sanitarie, per il controllo sanitario in caso di grandi spostamenti di persone da zone ad alta incidenza d'infezione verso zone indenni, per i territori ove le dotazioni strutturali e infrastrutturali non consentono il monitoraggio capillare dei soggetti infetti con i metodi diagnostici attualmente commercializzati.

La diagnosi indiretta di tubercolosi bovina, infezione sostenuta da *Mycobacterium bovis*, costantemente soggetta a piani di eradicazione per le gravi patologie che induce nel bestiame allevato e per essere una delle principali zoonosi, non può essere eseguita con i normali metodi sierologici e si basa sui metodi di rilevamento della risposta cellulare, quali:

- prova *in vivo* o skin test, che va letta dopo 72 ore, che evidenzia una reazione di ipersensibilità ritardata di tipo IV dell'ospite infetto, in seguito all'inoculazione di apteni del micobatterio;

- prova in campione ematico mediante gamma-interferon test, che va letta dopo 18-24 ore, che evidenzia il rilascio di interleuchine, in particolare del gamma-interferon, dai linfociti TH1 cooperanti della risposta cellulo-mediata, se precedentemente sensibilizzati dall'infezione tubercolare, quando sono posti in coltura e sono stimolati dalla presenza di antigeni o apteni tubercolari.

Nel bovino la distinzione tra tubercolosi attiva e tubercolosi latente appare superflua, poiché i piani di profilassi obbligatoria approvati a livello nazionale e internazionale non consentono il mantenimento di animali infetti, a qualsiasi stadio. Lo skin test, che richiede il sopralluogo in allevamento del Veterinario Ufficiale per 2 volte a distanza di 3 giorni, viene gradualmente sostituito dal test commerciale di rilevamento del gamma-interferon.

La predisposizione di kit per il test rapido di screening per tubercolosi bovina renderebbe più agevoli ed economici i controlli stabiliti dai piani di profilassi nazionali e sovranazionali, consentendo un grande risparmio di risorse, sia nelle zone che hanno già ottenuto la sua eradicazione, che nelle zone dove la tubercolosi è ancora presente ed è necessario un assiduo controllo dei capi allevati per arginare la diffusione dell'infezione tra le popolazioni animali e per ridurre il rischio di trasmissione all'uomo di questa importante zoonosi.

Kit diagnostici rapidi e di facile esecuzione sono necessari anche per la diagnosi indiretta in stadio precoce di paratubercolosi o malattia di Johne, infezione sostenuta da *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis*, quando la risposta immunitaria dell'ospite infetto è di tipo cellulare e si ha escrezione del patogeno con contaminazione dell'ambiente e trasmissione nella popolazione di animali; la risposta immunitaria umorale, rilevabile attraverso normali test sierologici, si sviluppa negli stadi successivi e presenta minori problematiche di indagine. La paratubercolosi, oltre ad inficiare la redditività degli allevamenti di ruminanti, è una sospetta zoonosi probabilmente correlabile al morbo di Crohn nell'uomo.

Nello stato dell'arte non si riscontrano sistemi per la strutturazione di kit diagnostici rapidi che evidenzino la risposta immunitaria cellulare dell'ospite verso microrganismi patogeni che inducono infezioni non diagnosticabili attraverso saggi di rilevamento di anticorpi; non si riscontrano, inoltre, sistemi utilizzabili senza strumentazioni di laboratorio, basati sul rilevamento simultaneo di differenti cellule che espongono specifici marker di infezione che possono essere simultaneamente quantificati; non si rinvenivano neppure fasi solide per reazioni immunoenzimatiche ed ELISA che possano essere utili per l'esecuzione di saggi di rilevamento simultaneo sia di differenti marker che delle differenti cellule che li espongono.

Nel brevetto **EP 0 154 687** si illustra, infatti, un sistema caratterizzato da un primo livello di recesso che accoglie il liquido contenente le cellule, che sommerge i pozzetti singoli nei quali,

attraverso elementi immunoassorbenti che vengono inseriti, si può rilevare la presenza di proteine secrete dalle cellule stesse e non di marcatori presenti sulla loro superficie. Il tipo cellulare, inoltre, potrebbe essere individuato in seguito al recupero del liquido presente in ciascun pozzetto, con un altro test, con modalità che non sono compatibili con l'allestimento di saggi rapidi.

In **WO 03/085401**, dal quale la presente invenzione deriva, si illustra un sistema che offre la possibilità di predisporre kit che non richiedono strumentazioni di laboratorio per l'esecuzione di analisi immunoenzimatiche multiple, in quanto includono micropiastre o microstrip pre-riempite dei reagenti necessari per l'esecuzione di saggi. Il vantaggio è dato dall'utilizzazione della micropiastro come mero contenitore di reagenti, mentre la funzione di fase solida è assunta dal dispositivo a punte che può essere direttamente immerso nel tubo di raccolta del campione e poi nei pozzetti delle micropiastre o delle microstrip contenenti i reagenti. Il dispositivo e il metodo presentati in WO 03/085401 e nelle pubblicazioni scientifiche che illustrano i risultati sperimentali ottenuti con la sua applicazione in diversi campi non sono, però, sufficienti per effettuare, nello stesso procedimento analitico, due tipi di rilevazione multipla: l'identificazione dei tipi linfocitari che espongono determinati marker e la determinazione quantitativa dei differenti marker di interesse, onde soddisfare le esigenze diagnostiche per la tubercolosi, infezione caratterizzata dalla predominante risposta immunitaria cellulare. Essi risultano idonei agli scopi diagnostici illustrati quando vengono utilizzati in combinazione con una fase solida innovativa con pozzetti allungati, appositamente conformata per accogliere le punte in gruppi.

In **WO 2207/039400** si illustrano un procedimento e un kit basati sul rilevamento simultaneo di differenti citochine prodotte in eccesso da linfociti sensibilizzati dall'infezione tubercolare quando stimolati da determinati antigeni tubercolari con i quali sono posti in incubazione per 6 - 72 ore, rispetto ad altri antigeni tubercolari usati come controllo; l'esecuzione del procedimento richiede personale esperto e laboratori attrezzati.

In **DE 103 33 545** si illustra un sistema a vari moduli che si compongono per ottenere più livelli di recesso con elementi variamente conformati e disposti, che non sono idonei a essere introdotti in un lettore ELISA commercialmente disponibile per procedere alla lettura dei risultati analitici.

In **WO 96/02836** viene descritto un sistema computerizzato, incompatibile con le finalità qui espresse, per analisi di acidi nucleici che sono possibili solo in caso di presenza del patogeno nel campione clinico e non sono perciò applicabili alla diagnosi di infezione tubercolare extra polmonare; nel sistema è presente un pettine a denti piatti, che possono penetrare in specifici

pozzetti, ma che ha dimensioni e formato tali da non poter essere utilizzato secondo le finalità espresse nella presente invenzione, che prevede anche l'immersione dell'intero dispositivo a punte in provette, per ottenere una riduzione dei costi dei kit per diagnosi di tubercolosi, onde agevolare la diagnosi nei Paesi in via di sviluppo che presentano la maggiore incidenza di infezione nella popolazione.

In **US 2007/237687** i dispositivi illustrati differiscono sostanzialmente dalle micropiastre e microstrip a pozzetti allungati qui presentati per la presenza di strozzature che interferirebbero con l'omogenea distribuzione del campione al loro interno e con l'omogenea distribuzione della fase liquida a contatto con le 2 fasi solide, indispensabile per ottenere un risultato diagnostico attendibile.

In **US 2010/083778** si presentano dispositivi idonei a trattenere substrati non porosi che vengono sottoposti a screening simultanei, assolutamente non idonei all'allestimento dei kit qui presentati in quanto non prevedono la separazione in singoli pozzetti, indispensabile per la corretta quantificazione dei marker di interesse diagnostico qui illustrata.

In **DE 10 2008 021365** il supporto idoneo a ricevere reagenti attraverso microcannule si differenzia da quanto qui ideato e presentato soprattutto per il fatto che non presenta nella stessa fila più pozzetti allungati, utili per la predisposizione di un kit ove sia possibile allestire un test di controllo da eseguire in parallelo all'analisi del campione, in una sola fila di una micropiastre o in una microstrip interamente dedicata ad un campione da analizzare per il rilevamento di differenti tipi cellulari, ciascuno dei quali espone differenti marker da quantificare.

La presente invenzione nasce, quindi, per soddisfare l'esigenza di realizzare un dispositivo, un metodo e kit utili al rilevamento di differenti marker cellulari o molecolari e alla loro quantificazione simultanea sulle differenti cellule o molecole che li espongono; in particolare i kit sono utili alla diagnosi di tubercolosi, essendo di facile utilizzazione e richiedendo minime dotazioni strumentali di laboratorio.

Strutturazione di kit per diagnosi rapida di tubercolosi basata sul rilevamento simultaneo di differenti marker esposti su linfociti T CD4 e su linfociti T CD8

Si illustrano di seguito esempi di strutturazione di kit pronti all'uso che utilizzano i dispositivi a pozzetti allungati e la reazione di competizione tra 2 fasi solide di diversa conformazione, ideati per la diagnosi rapida di tubercolosi umana e per la diagnosi rapida di tubercolosi bovina abbinata alla diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce, per l'emissione del referto analitico

entro poche ore, basati sul rilevamento dei linfociti T CD 8 citolitici, dei linfociti TH1 cooperanti della risposta cellulare e dei linfociti TH2 cooperanti della risposta umorale T CD 4, sensibilizzati in conseguenza dell'infezione tubercolare.

Un esempio di strutturazione di kit diagnostico pronto all'uso per tubercolosi umana, per campione singolo, può comprendere:

- 1 microstrip a 3 pozzetti allungati, ciascuno dell'estensione di 4 pozzetti circolari di micropiastra standard a 96 pozzetti, sensibilizzati come di seguito specificato:
 - il pozzetto 1 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD4 per il legame con i linfociti T cooperanti, che si legano in immunocomplesso sulla superficie;
 - il pozzetto 2 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD8 per il legame con i linfociti T citolitici, che si legano in immunocomplesso sulla superficie;
 - il pozzetto 3 non è sensibilizzato e funge da controllo negativo per evidenziare eventuali reazioni aspecifiche;
- 1 pipetta monouso per la distribuzione delle 3 aliquote di campione nei 3 pozzetti allungati;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio con dispensatore per il lavaggio dei pozzetti allungati dopo l'incubazione del campione;
- 2 tubi con soluzione di lavaggio di dimensioni tali che l'intero dispositivo a punte possa esservi immerso dopo le fasi di incubazione delle punte;
- 3 fiale contenenti mix standardizzato di antigeni di *Mycobacterium tuberculosis*, che a titolo esemplificativo e non esaustivo possono essere ESAT-6, CFP-10 e TB 7.7 biotinilati;
- 1 dispositivo a 12 elementi immunoassorbenti sporgenti da un'asta, sensibilizzato con gli anticorpi monoclonali (MAb) come di seguito specificato:
 - elemento 1: MAb per ESAT -6;
 - elemento 2: MAb per CFP-10;
 - elemento 3: MAb per TB 7.7;
 - elemento 4: nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
 - elemento 5: MAb per ESAT -6;
 - elemento 6: MAb per CFP-10;
 - elemento 7: MAb per TB 7.7;
 - elemento 8: nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
 - elemento 9: MAb per ESAT -6;
 - elemento 10: MAb per CFP-10;
 - elemento 11: MAb per TB 7.7;
 - elemento 12: nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
- 1 tubo contenente coniugato, ad esempio perossidasi di rafano-streptoavidina;
- 1 microstrip standard a 12 pozzetti;

- 1 flacone con gocciolatore, contenente substrato cromogeno, ad esempio trimetilbenzidina (TMB);
- tamponi di carta bibula.

Alternativamente, può essere usata una micropiastra standard a 96 pozzetti non immunoadsorbente, pre-riempita di soluzione di lavaggio per gli elementi, coniugato e substrato cromogeno, così distribuiti:

- soluzione di lavaggio nei pozzetti delle file A, B,C, E, F e G;
- coniugato streptoavidina / enzima nei pozzetti della fila D;
- substrato cromogeno nei pozzetti della fila H.

1. CATTURA DEI LINFOCITI – Il campione ematico addizionato di anticoagulante va dispensato, in tre aliquote da 1 mL ciascuna, nei pozzetti allungati della microstrip. Si lascia ad incubare per consentire la cattura dei linfociti T cooperanti alla superficie del pozzetto di forma allungata 1 e dei linfociti T citolitici alla superficie del pozzetto di forma allungata 2.

2. COMPETIZIONE TRA 2 FASI SOLIDE PER IL LEGAME CON GLI ANTIGENI BIOTINILATI - Al termine dell'incubazione, i pozzetti allungati vanno lavati 3 volte con soluzione di lavaggio; in ciascun pozzetto si inocula una fiala contenente il mix standardizzato di antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB 7.7 biotinilati.

Sulla microstrip si appoggia il dispositivo sensibilizzato a 12 elementi in modo da immergere 4 elementi in ogni pozzetto allungato e si lascia ad incubare.

Gli anticorpi immobilizzati sugli elementi del dispositivo legano gli antigeni biotinilati competendo, nel pozzetto allungato 1, con i linfociti T CD4 sensibilizzati dall'infezione tubercolare catturati sulla superficie e competendo, nel pozzetto allungato 2, con i linfociti T CD8 sensibilizzati dall'infezione tubercolare catturati sulla superficie.

Al termine dell'incubazione, la quantità di antigeni biotinilati legati in immunocomplesso su ogni specifico elemento è inversamente proporzionale alla presenza dei marker dei linfociti sensibilizzati e catturati sulla superficie del pozzetto allungato, che hanno legato parte degli stessi antigeni attraverso gli specifici recettori superficiali, ove presenti come conseguenza dell'infezione tubercolare.

3. LEGAME DEL CONIUGATO AGLI ELEMENTI - Al termine dell'incubazione, il dispositivo a elementi immunoadsorbenti sporgenti da un'asta va sollevato e immerso in uno dei due tubi contenenti soluzione di lavaggio. Dopo asciugatura delle punte, per contatto dell'estremità distale con il tampone di carta bibula, l'intero dispositivo va immerso nel tubo contenente il coniugato e posto ad incubare.

Alternativamente, se i reagenti sono pre-distribuiti in micropiastra, gli elementi vanno introdotti nei pozzetti della fila A della micropiastra standard a 96 pozzetti, in modo che ciascun elemento penetri in un pozzetto contenente soluzione di lavaggio, quindi gli elementi vanno asciugati su carta bibula. Il lavaggio va ripetuto anche nei pozzetti delle file B e C, sempre seguito da

asciugatura. Dopo il lavaggio, gli elementi vanno immersi nei pozzetti della fila D, contenenti il coniugato e si pone ad incubare.

4. REAZIONE CROMOGENA - Al termine dell'incubazione nel coniugato, il dispositivo a elementi immunoassorbenti sporgenti da un'asta va sollevato e introdotto nell'altro dei due tubi contenenti soluzione di lavaggio. Dopo asciugatura degli elementi, per contatto dell'estremità distale con il tampone di carta bibula, essi vanno singolarmente immersi nei pozzetti della microstrip nei quali è stato previamente distribuito il substrato cromogeno.

Alternativamente, se i reagenti sono pre-distribuiti in micropiastra, gli elementi vanno lavati nei pozzetti delle file E, F e G, asciugati di volta in volta e infine immersi nei pozzetti della fila H, contenenti il substrato cromogeno.

Dopo incubazione, gli elementi vanno estratti e si procede alla lettura spettrofotometrica tramite lettore ELISA della D.O. della soluzione nei pozzetti nei quali si è sviluppata la reazione cromogena. In assenza di strumenti di lettura, si può procedere alla lettura visiva confrontando il colore di ciascun pozzetto dedicato ai test con quello dei pozzetti che contengono i controlli negativi.

5. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI - La D.O. rilevata è inversamente proporzionale alla quantità di linfociti presenti nel campione di sangue, rispettivamente cooperanti CD4 o citotossici CD8, per il rispettivo antigene tubercolare; l'interpretazione dei risultati del test va fatta in relazione alla D. O. misurata in corrispondenza degli elementi 9, 10 e 11 che, in assenza di linfociti competitori nel pozzetto allungato 3, legano la massima quantità di ciascun antigene biotinilato, mentre gli elementi 4, 8 e 12 costituiscono il controllo di specificità.

Il controllo positivo va allestito parallelamente per ottenere la curva di taratura utile per l'interpretazione quantitativa dei risultati analitici e il calcolo del cut-off.

In base ai progressi scientifici, differenti marker e differenti tipi cellulari possono essere sostituiti o introdotti tra quelli che il kit può essere in grado di rilevare e quantificare e dei quali si è dato solo un esempio.

La strutturazione di un kit analogo per diagnosi di tubercolosi bovina abbinata a diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce può essere ottenuta con gli apteni:

- tubercolina bovina come marker di infezione tubercolare da quantificare sui diversi linfociti T CD4 e T CD8;
- tubercolina aviaria, per evidenziare risultati falsamente positivi dovuti a reazione crociata dell'infezione transitoria da *Mycobacterium avium*;
- johnina, come marker di infezione paratubercolare da quantificare sui diversi linfociti T CD4 e T CD8.

I kit pronti all'uso per numerosi campioni devono essere strutturati in modo da comprendere almeno:

- microstrip con 3 pozzetti allungati, ognuno dei quali è in grado di accogliere 4 punte ogivali dei dispositivi sensibilizzati, o le micropiastre a 3 pozzetti di forma allungata disposti in 8 file corrispondenti alle file contrassegnate da A ad H nelle micropiastre standard, sensibilizzati come sopra specificato per ciascun tipo di diagnosi;
- fiale con il mix standardizzato di antigeni o di apteni biotinilati;
- dispositivi a 12 punte sensibilizzate come sopra descritto per ciascun tipo di diagnosi;
- tubi contenenti soluzione di lavaggio, tubi contenenti il coniugato, micropiastre standard a 96 pozzetti o un numero sufficiente di microstrip standard a 12 pozzetti dove va distribuito il substrato cromogeno;
- tamponi di carta bibula per l'asciugatura delle punte.

Nel caso di uso di micropiastre pre-riempite, si dovranno includere nei kit, alternativamente ai tubi con coniugato e con soluzione di lavaggio, micropiastre standard a 96 pozzetti o un numero sufficiente di microstrip standard a 12 pozzetti pre-riempite con coniugato e altrettante pre-riempite con substrato cromogeno;

- flaconi con soluzione di lavaggio dotati di erogatore;
- supporto per contenere e muovere contemporaneamente i dispositivi a 12 elementi immunoassorbenti dalla micropiastro contenente il coniugato a quella contenente il substrato cromogeno. L'esecuzione manuale dei test, in questo caso, prevede che, dopo l'incubazione dei campioni ematici nei pozzetti allungati e il lavaggio di questi ultimi, in ciascuno di essi vada inoculato il mix standardizzato di antigeni o apteni di micobatteri prescelti e venga posizionato il supporto contenente 8 dispositivi a 12 elementi immunoassorbenti sensibilizzati, che consente di spostare contemporaneamente i dispositivi stessi, in modo che gli elementi immunoassorbenti siano: - immersi nei pozzetti allungati e posti ad incubare; - lavati e asciugati; - immersi nei pozzetti standard contenenti il coniugato e posti ad incubare; - lavati e asciugati; - immersi nei pozzetti standard contenenti il substrato cromogeno e posti ad incubare; - estratti per la lettura mediante lettore ELISA di questi ultimi pozzetti, nei quali si è sviluppata la reazione cromogena.

La semplicità delle operazioni che si susseguono nel procedimento diagnostico rende agevole l'eventuale robotizzazione dell'uso dei kit predisposti come descritto.

Breve descrizione delle figure

In Figura 1, la microstrip (11) ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozzetti e contiene 3 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (10) è idoneo ad accogliere 4 elementi (12) del dispositivo (13) a 12 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti e di microstrip standard a 12 pozzetti.

In Figura 2, la microstrip (21) ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozzetti e contiene 4 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (20) è idoneo ad accogliere 3 elementi (22) del dispositivo (23) a 12 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti e di microstrip standard a 12 pozzetti.

In Figura 3, la microstrip (31) ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozzetti e contiene 2 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (30) è idoneo ad accogliere 6 elementi (32) del dispositivo (33) a 12 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti e di microstrip standard a 12 pozzetti.

In Figura 4, la microstrip (41) ha dimensione di una microstrip standard a 8 pozzetti e contiene 2 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (40) è idoneo ad accogliere 4 elementi (42) del dispositivo (43) a 8 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti e di microstrip standard a 8 pozzetti.

In Figura 5, la micropiastra (51) ha dimensione di una micropiastra standard a 96 pozzetti e contiene 24 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (50) è idoneo ad accogliere 4 elementi (52) del dispositivo (53) a 12 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti.

In Figura 6, la micropiastra (61) ha dimensione di una micropiastra standard a 96 pozzetti e contiene 32 pozzetti allungati di uguale dimensione; ogni pozzetto allungato (60) è idoneo ad accogliere 3 elementi (62) del dispositivo (63) a 12 elementi, che sporgono da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozzetti di micropiastre standard a 96 pozzetti.

Rivendicazioni

1. Dispositivo per il rilevamento di differenti marker in differenti tipi cellulari o molecolari e loro quantificazione costituito da microstrip o micropiastre con pozzetti e aste con elementi sporgenti immunoadsorbenti posti a distanza modulare secondo la disposizione di pozzetti di micropiastre o microstrip standard, caratterizzato dal fatto che i pozzetti sono di forma allungata atti ad accogliere al loro interno 3 o 4 o 6 di detti elementi, che i pozzetti immobilizzano un differente tipo cellulare o molecolare presente nel campione in esame, che gli elementi immunoadsorbenti sono sensibilizzati con uno degli stessi marker che si vogliono rilevare nel campione in esame, che, quando gli elementi sporgenti sono introdotti nei pozzetti, detti pozzetti contengono un ligando in fase liquida sia per i marker dei differenti tipi cellulari o molecolari presenti nel campione in esame immobilizzati in detti pozzetti sia per i marker che sensibilizzano gli elementi sporgenti delle aste.
2. Metodo per il rilevamento di differenti marker in differenti tipi cellulari o molecolari e loro quantificazione utilizzando i dispositivi della rivendicazione precedente caratterizzato dal fatto che comprende i seguenti passi:
 - a) su pozzetti di micropiastre o microstrip, di forma allungata, atti ad accogliere al loro interno 3 o 4 o 6 elementi immunoadsorbenti sporgenti da aste posti a distanza modulare, viene immobilizzato un differente tipo cellulare o molecolare presente nel campione in esame;
 - b) sugli elementi sporgenti immunoadsorbenti vengono immobilizzati detti marker che si vogliono rilevare nel campione in esame;
 - c) gli elementi immunoadsorbenti sporgenti dalle aste vengono introdotti nei pozzetti allungati riempiti con un ligando in fase liquida per i marker da rilevare e, quindi, sia per i differenti tipi cellulari o molecolari presenti nel campione in esame immobilizzati in detti pozzetti sia per i marker che sensibilizzano gli elementi sporgenti delle aste;
 - d) detti ligandi si legano agli elementi immunoadsorbenti in quantità inversamente proporzionale alla quantità dei relativi marker espressi da ciascun tipo cellulare o molecolare immobilizzato sul relativo pozzetto allungato e sono quantificabili simultaneamente attraverso un saggio immunoenzimatico;
 - e) si immerge l'asta o le aste recanti gli elementi immunoadsorbenti in un contenitore contenente il coniugato;
 - f) e, successivamente, si immerge ogni singolo elemento in singoli pozzetti di microstrip o micropiastre standard contenenti substrato cromogeno,
 - g) in ognuno dei quali, infine, si esegue la lettura spettrofotometrica.

3. Kit per il rilevamento di differenti marker in differenti tipi cellulari o molecolari e loro quantificazione utilizzando il dispositivo e il metodo secondo le rivendicazioni 1 e 2 caratterizzato dal fatto che esso comprende:

- microstrip con 3 pozzetti di forma allungata, ognuno dei quali è in grado di accogliere 4 elementi sensibilizzati sporgenti da un'asta; il primo pozzetto di forma allungata è sensibilizzato con anticorpi anti CD4 per l'immobilizzazione dei linfociti T cooperanti presenti in un campione di sangue e il secondo pozzetto di forma allungata è sensibilizzato con anticorpi anti CD8 per l'immobilizzazione dei linfociti T citolitici presenti nello stesso campione ematico; un terzo pozzetto di forma allungata non è sensibilizzato e funge da controllo negativo, essendo pre-riempito di soluzione tampone;
- fiale con un mix standardizzato di antigeni o di apteni di micobatteri di cui si vuole diagnosticare l'infezione, in grado di legarsi specificamente ai marker che si intende rilevare sui linfociti del campione in esame;
- dispositivi a 12 elementi sporgenti, ciascuno dei quali è sensibilizzato con uno dei marker che si intende rilevare su ciascun tipo di linfociti sensibilizzati dall'infezione di micobatteri;
- micropiastre standard a 96 pozzetti con 8 file da 12 pozzetti ciascuna, identificate rispettivamente con le lettere A, B, C, D, E, F, G ed H, non immunoassorbenti, o contenitori in forma di provette o vaschette contenenti coniugato e soluzione di lavaggio;
- micropiastre standard a 96 pozzetti con 8 file da 12 pozzetti ciascuna, identificate rispettivamente con le lettere A, B, C, D, E, F, G ed H, non immunoassorbenti, contenenti substrato cromogeno;
- tamponi di carta bibula.

Fig. 1

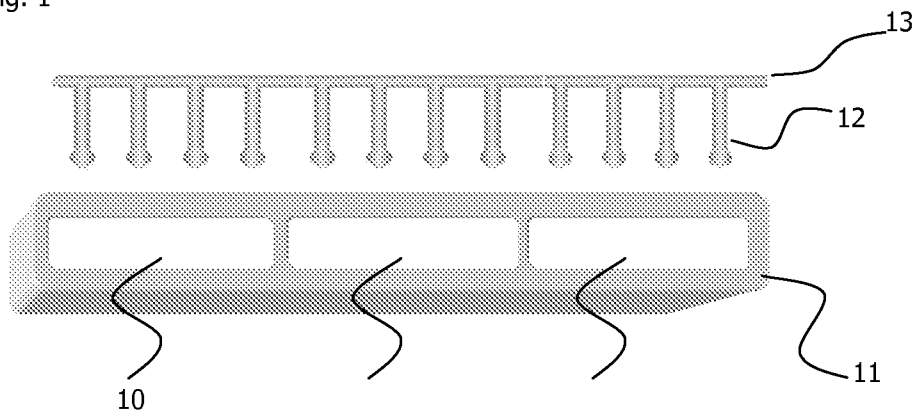


Fig. 2

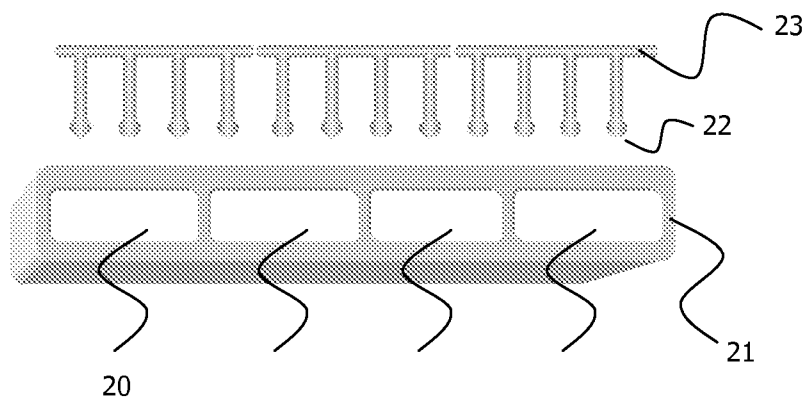


Fig. 3

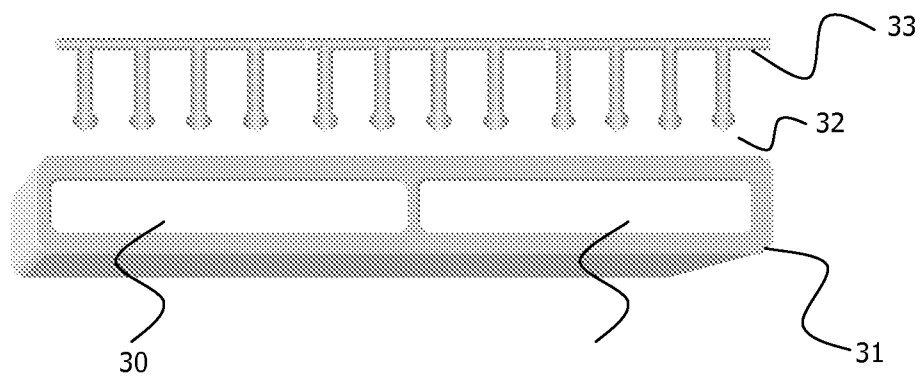


Fig. 4

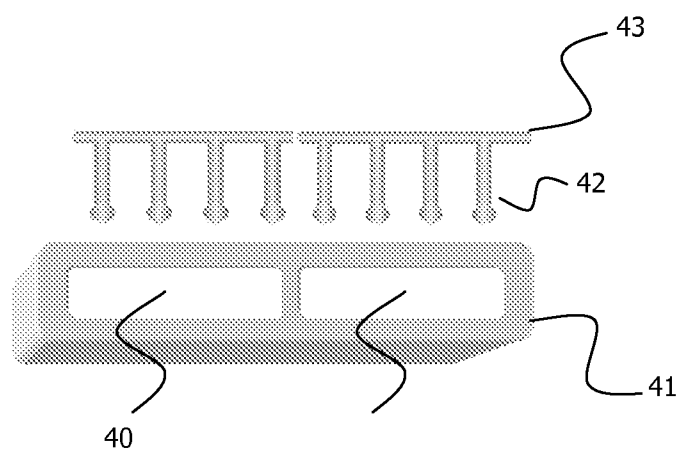


Fig. 5

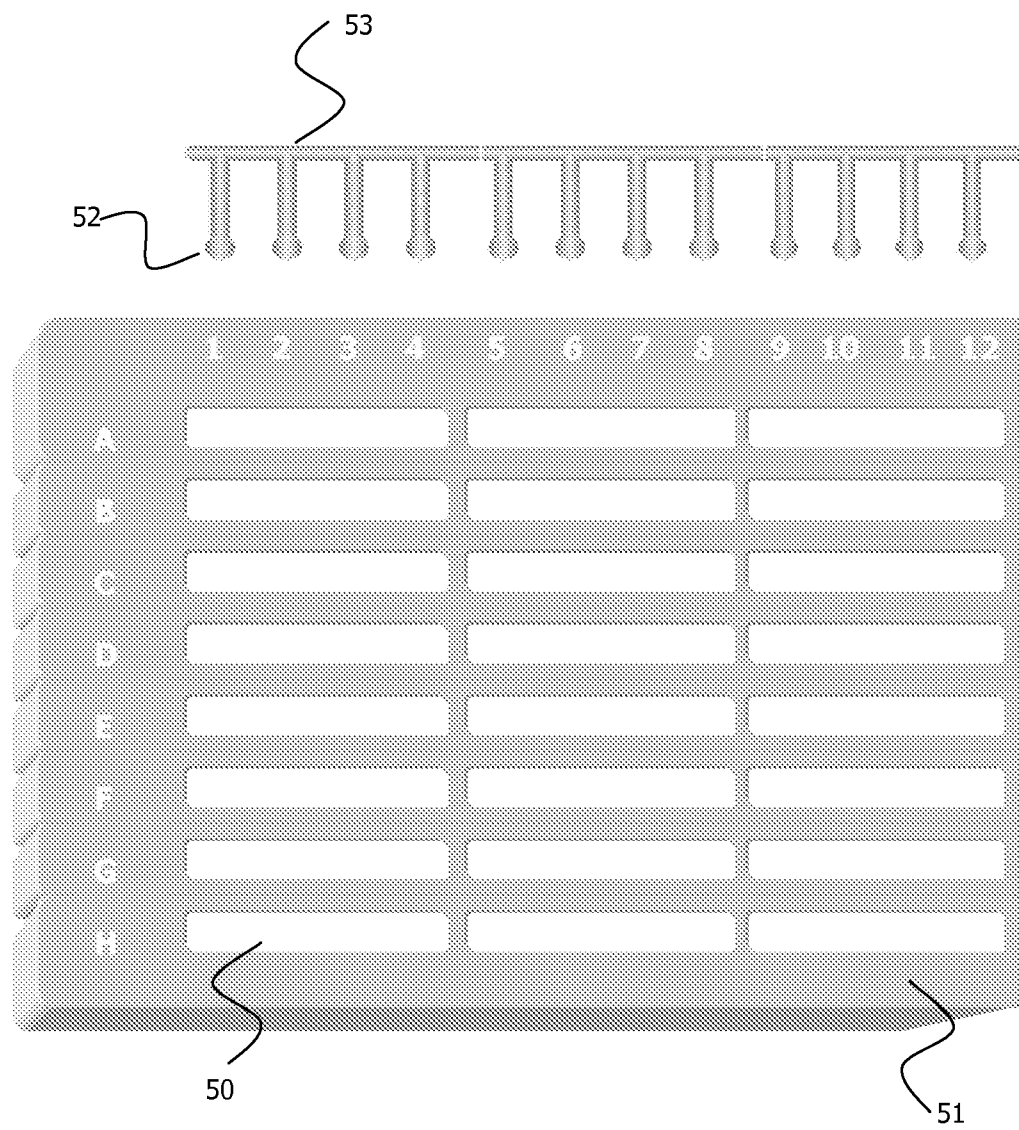


Fig. 6

