



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102011901938208
Data Deposito	21/04/2011
Data Pubblicazione	21/10/2012

Classifiche IPC

Titolo

METODO ANALITICO DI COMPETIZIONE TRA 2 FASI SOLIDE PER IL RILEVAMENTO SIMULTANEO DI DIFFERENTI MARKER CELLULARI O MOLECOLARI, DISPOSITIVO COSTITUITO DA MICROPIASTRE O MICROSTRIP CON POZZETTI DI FORMA ALLUNGATA PER L'ESECUZIONE DI DETTO METODO E RELATIVI KIT ANALITICI PRONTI ALL'USO

**Metodo analitico di competizione tra 2 fasi solide  
per il rilevamento simultaneo di differenti marker cellulari o molecolari,  
dispositivo costituito da micropiastre o microstrip con pozzetti di forma  
allungata per l'esecuzione di detto metodo e relativi kit analitici pronti  
all'uso**

**Descrizione dell'invenzione**

La presente invenzione si riferisce ad un metodo analitico di competizione tra 2 fasi solide per il rilevamento simultaneo e quantitativo di differenti marker cellulari e molecolari e a kit pronti all'uso che contengono nuovi pozzetti di forma allungata per l'esecuzione di detto metodo, in abbinamento ad aste con elementi sporgenti che vanno introdotti in numero di 3 o 4 o 6 in detti pozzetti, utile anche per la diagnosi rapida di tubercolosi nell'uomo e per la diagnosi rapida di tubercolosi bovina abbinata alla diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce condotte attraverso il rilevamento di marker superficiali di linfociti T cooperanti e di linfociti T citotossici sensibilizzati dall'infezione.

In particolare l'invenzione si riferisce a:

- nuovo metodo analitico di competizione tra 2 fasi solide per il rilevamento simultaneo di differenti marker di superficie cellulare o di differenti marker molecolari, come ad esempio gli epitopi di un antigene, che prevede i seguenti passi:
  - a) il materiale in esame sul quale si intende rilevare la presenza di differenti marker viene immobilizzato in un pozzetto di forma allungata che costituisce la prima fase solida;
  - b) si lava il pozzetto;
  - c) dopo il lavaggio del pozzetto di forma allungata, una quantità standardizzata di mix di ligandi, ovvero di molecole ciascuna delle quali si leghi specificamente ad uno dei marker da rilevare, viene inoculata nel pozzetto;
  - d) nel pozzetto vengono immersi 3 o 4 o 6 elementi sporgenti da un'asta, sulla quale sono posizionati a distanza modulare che coincide con la distanza modulare dei pozzi di microstrip o micropiastre standard, che costituiscono la seconda fase solida, su ciascuno dei quali è stato precedentemente immobilizzato uno dei marker da rilevare;
  - e) durante un determinato tempo di incubazione si instaura una reazione di competizione tra le 2 fasi solide per la cattura dei ligandi, che possono legarsi

specificamente sia ai marker del materiale in esame immobilizzato sul pozzetto, che ai marker separatamente immobilizzati su ciascuno di detti elementi;

g) detti elementi vengono estratti e sottoposti a saggio immunoenzimatico o altro saggio di rilevamento quantitativo di ciascun ligando, che sarà presente sul rispettivo elemento in quantità inversamente proporzionale alla quantità dello stesso marker presente nel materiale in esame;

- pozzetti di forma allungata di microstrip o micropiastre di materiale idoneo alla coltivazione e/o alla fissazione di cellule o all'immunoadsorbimento di cellule o di antigeni o di anticorpi, di formato idoneo ad accogliere al loro interno 3 o 4 o 6 elementi sporgenti da un'asta, sulla quale detti elementi sono disposti a distanza modulare che coincide con la disposizione modulare dei pozzetti standard di micropiastre o di microstrip;

- kit diagnostici pronti all'uso per il rilevamento simultaneo e quantitativo di differenti marker, basati sul metodo di competizione tra 2 fasi solide, come per esempio kit per la diagnosi di tubercolosi nell'uomo e kit per la diagnosi di tubercolosi bovina abbinata alla diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce, che prevedono: l'incubazione del campione ematico in due pozzetti di forma allungata per l'adsorbimento selettivo dei linfociti T cooperanti in un pozzetto e dei linfociti T citolitici nell'altro pozzetto; il successivo lavaggio dei pozzetti di forma allungata; l'inoculazione nei pozzetti di forma allungata di un mix standardizzato di antigeni di micobatteri e l'introduzione di 4 elementi, ciascuno sensibilizzato con uno dei marker che si intende rilevare sui linfociti adsorbiti; il rilevamento quantitativo di ciascun antigene legato sul rispettivo elemento attraverso saggio immunoenzimatico condotto immergendo singolarmente detti elementi in pozzetti di micropiastra o microstrip standard non adsorbente, pre-riempiti e contenenti, in sequenza, soluzione di lavaggio, coniugato, soluzione di lavaggio e substrato cromogeno, o in micropiastre contenenti coniugato e, dopo lavaggio, in micropiastre contenenti substrato cromogeno, secondo quanto descritto nei brevetti EP 1 499 894 B1, USPTO 7,510,687, SIPO PCR ZL 03 8 10029.0 e PCT WO/2003/085401 del 16.10.2003, dai quali la presente invenzione deriva.

Le microstrip o micropiastre con pozzetti di forma allungata 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 esse contengano un numero inferiore di pozetti, secondo una delle modalità di seguito indicate:

- 2 pozetti di forma allungata, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozetti standard, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 8 pozetti e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 4 elementi sporgenti da un'asta, sulla quale detti elementi sono disposti a distanza modulare che coincide con la disposizione modulare dei pozetti standard di micropiastre o di microstrip;
- 2 pozetti di forma allungata, ciascuno corrispondente all'estensione di 6 pozetti standard, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 6 dei suddetti elementi;
- 3 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozetti standard, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 4 dei suddetti elementi;
- 4 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 3 pozetti standard, possono essere presenti nella microstrip della dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 3 dei suddetti elementi.

Nella micropiastra delle dimensioni di una micropiastra standard possono essere presenti:

- 2 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozetti standard, in ciascuna delle 12 colonne contrassegnate da 1 ad 12, per un totale di 24 pozetti di forma allungata , ciascuno idoneo ad accogliere 4 dei suddetti elementi;
- 2 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 6 pozetti standard, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 16 pozetti di forma allungata , ciascuno idoneo ad accogliere 6 dei suddetti elementi;
- 3 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozetti standard, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 24 pozetti di forma allungata , ciascuno idoneo ad accogliere 4 dei suddetti elementi;

- 4 pozetti di forma allungata , ciascuno corrispondente all'estensione di 3 pozetti standard, in ciascuna delle 8 file contrassegnate da A ad H, per un totale di 32 pozetti di forma allungata, ciascuno idoneo ad accogliere 3 dei suddetti elementi.

La superficie interna dei pozetti di forma allungata può essere utilizzata 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.

Il fondo dei pozetti di forma allungata può essere alternativamente piatto o concavo, a ciascun formato può essere abbinata una superficie interna liscia o ondulata che consente di aumentare la quantità di materiale immobilizzato da sottoporre ad analisi.

La superficie interna dei pozetti di forma allungata può essere utilizzata per l'immobilizzazione di cellule tramite molecole di cattura immunoadsorbite e, eventualmente, per la separazione delle stesse cellule presenti in un pool; ad esempio i vari linfociti presenti in un campione ematico possono essere separati e immobilizzati tramite specifici anticorpi adsorbiti alla superficie e diretti contro un marcitore superficiale specifico per ciascuno dei tipi di cellule linfocitarie che si vuole immobilizzare.

La superficie interna dei pozetti di forma allungata può essere utilizzata per l'adsorbimento o la coltivazione o la fissazione di cellule che hanno subito infezione, ad esempio per rilevare la presenza di antigeni virus-specifici o virus-indotti susseguenti all'infezione con stipiti da strada o vaccinali.

La superficie interna dei pozetti di forma allungata può essere utilizzata per l'adsorbimento di antigeni dei quali si vuole rilevare la presenza di differenti epitopi.

L'elenco non è esaustivo ed è fornito solo a scopo esemplificativo.

Gli elementi sporgenti da un'asta a distanza modulare coincidente con la disposizione modulare dei pozetti di micropiastre o microstrip standard vengono introdotti nei pozetti di forma allungata in numero di 3 per le microstrip a 4 pozetti di forma allungata, ognuno dei quali ha l'estensione di 3 pozetti standard, in numero di 4 per le microstrip a 2 o a 3 pozetti di forma allungata, ognuno dei quali ha l'estensione di 4 pozetti standard, o in numero di 6 per le microstrip a 2 pozetti di forma allungata, ognuno dei quali ha l'estensione di 6 pozetti standard.

Un esempio di saggio di rilevamento quantitativo e simultaneo dei marker presenti nel materiale in esame - dopo l'immobilizzazione sulla fase solida 1 costituita dalla superficie interna del pozzetto di forma allungata e dopo la reazione di competizione avvenuta tra la fase solida 1 e la fase solida 2 costituita dagli elementi sensibilizzati immersi nel pozzetto di forma allungata in presenza di ligandi in fase liquida - è quello immunoenzimatico condotto secondo quanto descritto nei sopra citati brevetti dai quali la presente invenzione deriva, ovvero immergendo gli elementi in singoli pozetti di micropiastra standard non adsorbente, pre-riempiti dei reagenti necessari all'esecuzione del test, e precisamente coniugati e substrato cromogeno già pronti all'uso. Il test immunoenzimatico induce lo sviluppo di una densità ottica - D.O. - inversamente proporzionale alla quantità di ciascun marcitore presente sul materiale in esame ed entrato in competizione con l'analogo marcitore adsorbito a uno degli elementi. Tale competizione si instaura solo in presenza degli specifici marker nel materiale in esame, limitando la quantità di immunocomplesso formato sulla superficie del rispettivo elemento sporgente rispetto alla quantità totale dello specifico ligando, presente nel mix di ligandi aggiunti nel pozzetto di forma allungata in quantità nota per il rilevamento dei marker ricercati.

Altre tecniche di rilevamento qualitativo e quantitativo sono applicabili, quali i test di immunofluorescenza, l'immunoadsorbimento di particelle di metallo in grado di emettere segnali rilevabili con opportune strumentazioni e altre tecniche di laboratorio utili allo scopo.

A titolo esemplificativo e non esaustivo dell'uso dei pozetti di forma allungata per l'esecuzione del metodo di competizione tra 2 fasi solide attraverso kit pronti all'uso, si descrivono i kit per la diagnosi rapida di tubercolosi umana e per la diagnosi rapida di tubercolosi bovina abbinata alla diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce, utilizzando gli antigeni o gli apteni di uso comune per tali diagnosi, che possono essere sostituiti da eventuali nuovi marker la cui utilità sia messa in risalto dal progresso scientifico.

### **Stato dell'Arte**

Attualmente la diagnosi di tubercolosi nell'uomo, infezione sostenuta da *Mycobacterium tuberculosis*, si esegue mediante:

- prova *in vivo* con 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 tubercolare;
- prova in campione ematico mediante gamma-interferon test, commercialmente disponibile, che va letta dopo 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 che secernono gamma-interferon e altre interleuchine in presenza di specifici antigeni: ESAT-6, CFP-10, TB7.7.

Nel bovino, attualmente la diagnosi di tubercolosi bovina, infezione sostenuta da *Mycobacterium bovis*, si esegue mediante:

- 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, in quanto 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.

### **Necessità di metodi rapidi**

La predisposizione di kit per il test rapido di screening di infezione tubercolare nell'uomo, eseguibile in 3 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 a rischio d'infezione e per i territori ove le dotazioni strutturali e infrastrutturali non consentono il monitoraggio capillare dei soggetti infetti con i metodi diagnostici attualmente commercializzati.

La predisposizione di kit per il test rapido di screening per tubercolosi bovina renderebbe più agevoli 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 il rischio di trasmissione all'uomo di questa importante zoonosi.

Kit diagnostici rapidi e di facile esecuzione sono necessari anche per la diagnosi 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.

Si illustrano di seguito sia un metodo che un dispositivo e relativi kit pronto all'uso, 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 3 ore, basati sul rilevamento dei linfociti T citolitici, dei linfociti TH1 cooperanti della risposta cellulare e dei linfociti TH2 cooperanti della risposta umorale sensibilizzati in conseguenza dell'infezione tubercolare.

Finora i procedimenti analitici hanno consentito di sviluppare test immunoenzimatici di competizione in fase liquida, caratterizzati dal fatto che molecole uguali alle molecole da rilevare nel campione vengono marcate e addizionate al campione in fase liquida; le molecole marcate competono con le molecole da rilevare nel campione per il legame a molecole di cattura adsorbite alla fase solida; le molecole marcate addizionate al

campione in quantità nota saranno legate dalle molecole di cattura adsorbite alla fase solida in quantità inversamente proporzionale alla quantità delle molecole da rilevare presenti nel campione; le molecole del campione, infatti, legandosi alla fase solida impediscono il legame delle molecole marcate e, non essendo in grado di indurre il segnale generato dal marcitore, non vengono rilevate direttamente dal test, ma inducono un abbassamento del segnale che ci sarebbe se tutte le molecole marcate, in assenza di competitori, fossero state catturate sulla fase solida.

Tali reazioni competitive dei test immunoenzimatici sono ampiamente utilizzate per il rilevamento di anticorpi e di antigeni, ma consentono il rilevamento di un unico tipo di molecola per ciascun saggio.

Lo sviluppo di dispositivi a più elementi immunoadsorbenti, che possono essere introdotti contemporaneamente in un unico pozzetto allungato e che poi possono essere analizzati separatamente in pozzi standard perché disposti alla stessa distanza modulare dei pozzi di micropiastre o di microstrip standard, consente di rilevare simultaneamente differenti marker in un campione di materiale, utilizzando un nuovo tipo di saggio competitivo che non si basa sulla competizione di molecole in fase liquida per il legame alla fase solida, bensì sull'attrazione competitiva sviluppata dai marker immobilizzati su due fasi solide verso molecole addizionate in fase liquida; le molecole marcate o ligandi, aggiunti in fase liquida in quantità nota, possono legarsi alla fase solida costituita dal pozzetto allungato o alla fase solida costituita dagli elementi sensibilizzati introdotti nel pozzetto stesso; su questi ultimi la quantità di ciascun ligando marcato sarà limitata dalla competizione esercitata dalla fase solida costituita dal pozzetto; l'analisi separata mediante saggio immunoenzimatico del ligando catturato da ciascun elemento indurrà un segnale inversamente proporzionale alla quantità di marker del materiale in esame che ha sottratto dalla fase liquida il ligando stesso, impedendogli di essere catturato dal dispositivo.

Il vantaggio del metodo consiste nel poter rilevare simultaneamente differenti marker nel materiale in esame, utilizzando elementi che:

- nella prima parte della procedura di esecuzione del metodo sono tutti esposti alla competizione esercitata dai marker da rilevare immobilizzati sul pozzetto allungato, che consente di analizzare una quantità di campione maggiore rispetto a quella contenuta nei pozzi standard;

- nella seconda parte della procedura di esecuzione del metodo vengono analizzati separatamente, senza che vi sia necessità di differenziare il segnale di rilevamento per ciascun marker in esame.

La possibilità di rilevare direttamente mediante saggio immunoenzimatico i differenti marker superficiali di linfociti, che possono essere individuati simultaneamente distinguendo, inoltre, se sono presenti su linfociti T cooperanti o su linfociti T citolitici, apre la possibilità di sviluppo di metodi rapidi per la diagnosi di infezioni tubercolari, basati sul rilevamento simultaneo di marker di superficie di linfociti sensibilizzati dall'infezione, invece che sul rilevamento delle citochine, quali il gamma-interferon, che sono prodotte dai linfociti sensibilizzati quando stimolati dagli antigeni di micobatteri che si legano ai marker di superficie, ma che necessitano di 18-24 ore per essere rilevate.

Il nuovo metodo analitico di competizione tra 2 fasi solide per il rilevamento simultaneo di differenti marker di superficie cellulare prevede i seguenti passi:

- a) il materiale in esame sul quale si intende rilevare la presenza di differenti marker viene immobilizzato in pozetti di forma allungata che costituiscono la prima fase solida;
- b) si lava i pozetti;
- c) dopo il lavaggio dei pozetti di forma allungata, una quantità standardizzata di mix di ligandi, ovvero di molecole ciascuna delle quali si leghi specificamente ad uno dei marker da rilevare, marcati con biotina, viene inoculata nel pozzetto;
- d) nel pozzetto vengono immersi 4 elementi sporgenti da un'asta, sulla quale sono posizionati a distanza modulare che coincide con la distanza modulare dei pozetti di microstrip o micropiastre standard, che costituiscono la seconda fase solida, su ciascuno dei quali è stato precedentemente immobilizzato uno dei marker da rilevare;
- e) durante un determinato tempo di incubazione si instaura una reazione di competizione tra le 2 fasi solide per la cattura dei ligandi, che possono legarsi specificamente sia ai marker del materiale in esame immobilizzato sul pozzetto, che ai marker separatamente immobilizzati su ciascuno di detti elementi;
- g) detti elementi vengono estratti e sottoposti a saggio immunoenzimatico di rilevamento quantitativo di ciascun ligando, che sarà presente sul rispettivo elemento in quantità inversamente proporzionale alla quantità dello stesso marker presente nel

materiale in esame, utilizzando un coniugato contenente avidina che si legherà alla biotina grazie all'alta affinità delle molecole.

**Kit per diagnosi di tubercolosi nell'uomo basata sul rilevamento simultaneo di differenti marker mediante competizione tra 2 fasi solide**

Il kit diagnostico pronto all'uso per tubercolosi umana, per campione singolo, comprende:

- 1 microstrip a 3 pozetti di forma allungata sensibilizzati come di seguito specificato, di cui uno pre-riempito con diluente;
- 2 pipette monouso da 1 mL;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio da 20 mL con dispensatore;
- 3 fiale contenenti mix standardizzato di antigeni di *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 e TB 7.7 coniugati con biotina;
- 1 dispositivo a 12 elementi sporgenti, sensibilizzato come di seguito specificato;
- 1 micropiastra standard non immunoadsorbente a 96 pozetti pre-riempiti con i reagenti necessari all'esecuzione del test: soluzione di lavaggio, coniugato e substrato cromogeno;
- tamponi di carta bibula.

Nella microstrip con pozetti di forma allungata , il pozetto di forma allungata 1 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD4 per il legame con i linfociti T cooperanti, che si adsorbono alla superficie; il pozetto di forma allungata 2 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD8 per il legame con i linfociti T citolitici, che si adsorbono alla superficie; il pozetto di forma allungata 3 non è sensibilizzato e funge da controllo negativo per evidenziare eventuali reazioni aspecifiche.

Gli elementi del dispositivo sono sensibilizzate con gli anticorpi monoclonali:

- 1 - anti – ESAT -6;
- 2 – anti – CFP-10;
- 3 – anti – TB 7.7;
- 4 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
- 5 – anti - ESAT -6;
- 6 – anti - CFP-10;
- 7 – anti - TB 7.7;
- 8 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
- 9 – anti - ESAT -6;

- 10 – anti - CFP-10;
- 11 – anti - TB 7.7;
- 12 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo.

La micropiastra standard non immunoadsorbente a 96 pozetti è pre-riempita con:

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

1. ADSORBIMENTO DEI LINFOCITI – Il campione ematico addizionato di anticoagulante va dispensato, in due aliquote da 1 mL, nel pozzetto di forma allungata 1 e nel pozzetto di forma allungata 2 della microstrip. Si lascia ad incubare per consentire l'adsorbimento 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 STANDARDIZZATI -Al termine dell'incubazione, i pozetti di forma allungata vanno lavati 3 volte con soluzione di lavaggio; in ciascun pozzetto di forma allungata si inocula una fiala contenente il mix standardizzato di antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB 7.7 coniugati con biotina.

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

Gli anticorpi adsorbiti agli elementi del dispositivo legano gli antigeni coniugati con biotina competendo, nel pozzetto di forma allungata 1, con i linfociti CD4 sensibilizzati dall'infezione tubercolare adsorbiti alla superficie e competendo, nel pozzetto di forma allungata 2, con i linfociti CD8 sensibilizzati dall'infezione tubercolare adsorbiti alla superficie.

Al termine dell'incubazione, la quantità di antigeni coniugati con biotina legati in immunocomplesso su ogni specifico elemento sporgente è inversamente proporzionale alla presenza dei marker dei linfociti sensibilizzati e immobilizzati sulla superficie del pozzetto di forma allungata , che hanno legato parte degli stessi antigeni attraverso gli specifici recettori superficiali.

3. LEGAME DEL CONIUGATO AGLI ELEMENTI - Al termine dell'incubazione, il dispositivo va sollevato e gli elementi vanno immerse nei pozetti della fila A della micropiastra standard a 96 pozetti, in modo che ciascun elemento sporgente penetri in un pozzetto contenente soluzione di lavaggio.

Dopo il lavaggio nei pozzetti della fila A, gli elementi sporgenti vanno asciugati su carta bibula.

Il lavaggio va ripetuto anche nei pozzetti delle file B e C, sempre seguito da asciugatura.

Gli elementi sporgenti vanno, quindi, immerse nei pozzetti della fila D, contenenti il coniugato avidina/enzima – generalmente perossidasi di rafano HRP. Si lascia ad incubare.

4. REAZIONE CROMOGENA – Gli elementi sporgenti vanno lavati nei pozzetti delle file E, F e G, asciugate di volta in volta e infine immerse nei pozzetti della fila H, contenenti il substrato cromogeno – generalmente trimetilbenzidina TMB.

Dopo incubazione, gli elementi sporgenti vanno estratte e si procede alla lettura spettrofotometrica tramite lettore ELISA della D.O. della soluzione nei pozzetti della fila H della micropiastra.

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. rilevata in corrispondenza degli elementi sporgenti che, in assenza di linfociti competitori nel pozzetto di forma allungata, legano la massima quantità di ciascun antigene, mentre gli altri elementi sporgenti fungono da controllo negativo interno a ciascun pozzetto di forma allungata .

Il controllo positivo va allestito parallelamente utilizzando linfociti sensibilizzati che, se opportunamente dosati, consentono di ottenere una curva di taratura utile per l'interpretazione quantitativa dei risultati analitici.

### **Analisi dei campioni per diagnosi di tubercolosi nel bovino e di paratubercolosi in stadio precoce**

Per la specie bovina le microstrip con pozzetti di forma allungata vengono utilizzate, nella diagnosi di tubercolosi e di paratubercolosi in stadio precoce, come di seguito descritto.

Il kit pronto all'uso per diagnosi di tubercolosi bovina abbinata a diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce, per campione singolo, deve comprendere:

- 1 microstrip a 3 pozzetti di forma allungata sensibilizzati come di seguito specificato, di cui uno pre-riempito con diluente;
- 2 pipette monouso da 1 mL;

- 1 flacone da 20 mL contenente soluzione di lavaggio per i pozetti di forma allungata ;
- 3 fiale contenenti mix standardizzato di apteni PPD tubercolina bovina, PPD tubercolina aviare e johnina coniugati con biotina;
- 1 dispositivo con 12 elementi sporgenti, sensibilizzati come di seguito specificato;
- 1 micropiastra standard non immunoadsorbente a 96 pozetti pre-riempiti con i reagenti necessari all'esecuzione del test: soluzione di lavaggio, coniugato e substrato cromogeno;
- tamponi di carta bibula.

Nella microstrip con pozetti di forma allungata , il pozetto di forma allungata 1 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD4 per il legame con i linfociti T cooperanti, che si adsorbono alla superficie; il pozetto di forma allungata 2 è sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti CD8 per il legame con i linfociti T citolitici, che si adsorbono alla superficie; il pozetto di forma allungata 3 non è sensibilizzato e funge da controllo negativo per evidenziare eventuali reazioni aspecifiche.

Gli elementi del dispositivo sono sensibilizzate con gli anticorpi monoclonali:

- 1 - anti - PPD tubercolina bovina;
- 2 – anti - PPD tubercolina aviare;
- 3 – anti - johnina;
- 4 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
- 5 – anti - PPD tubercolina bovina;
- 6 – anti - PPD tubercolina aviare;
- 7 – anti - johnina; ;
- 8 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo;
- 9 – anti - PPD tubercolina bovina;
- 10 – anti - PPD tubercolina aviare;
- 11 – anti - johnina;
- 12 - nessuna sensibilizzazione - controllo negativo.

La micropiastra standard non immunoadsorbente a 96 pozetti è pre-riempita con:

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

1. ADSORBIMENTO DEI LINFOCITI - Il campione ematico va dispensato in due aliquote di 1 mL nel maxi-pozzetto 1 e nel pozzetto di forma allungata 2. Si pone ad incubare per consentire l'adsorbimento 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 APTENI STANDARDIZZATI - Al termine dell'incubazione, i pozetti di forma allungata vengono lavati 3 volte con soluzione di lavaggio e in ciascuno di essi si inocula 1 fiala del mix standardizzato di apteni PPD tubercolina bovina, PPD tubercolina aviare e johnina coniugati con biotina.

Sulla strip si appoggia il dispositivo sensibilizzato a 12 elementi sporgenti, in modo da immergere 4 elementi sporgenti in ogni pozzetto di forma allungata e si lascia ad incubare.

Gli anticorpi adsorbiti agli elementi legano gli apteni coniugati con biotina competendo nel pozzetto di forma allungata 1 con i linfociti CD4 sensibilizzati dall'infezione tubercolare o paratubercolare adsorbiti alla superficie e competendo nel pozzetto di forma allungata 2 con i linfociti CD8 sensibilizzati dall'infezione tubercolare o paratubercolare adsorbiti alla superficie.

Al termine dell'incubazione, la quantità di apteni legati in immunocomplesso su ogni specifico elemento è inversamente proporzionale alla presenza di linfociti sensibilizzati e immobilizzati sulla superficie del pozzetto di forma allungata, che hanno legato parte degli apteni attraverso gli specifici recettori superficiali.

3. LEGAME DEL CONIUGATO AGLI ELEMENTI - Al termine dell'incubazione, il dispositivo viene sollevato e gli elementi vengono immerse nei pozetti della fila A della micropiastra standard a 96 pozetti, in modo che ciascun elemento sporgente penetri in un pozzetto contenente soluzione di lavaggio.

Dopo il lavaggio nei pozetti della fila A, gli elementi vengono asciugate su carta bibula.

Il lavaggio viene ripetuto anche nei pozetti delle file B e C, sempre seguito da asciugatura.

Gli elementi sporgenti vanno, quindi, immerse nei pozetti della fila D, contenenti il coniugato.

Si lascia ad incubare.

4. REAZIONE COLORIMETRICA - Gli elementi vengono lavate nei pozzetti delle file E, F e G, asciugate di volta in volta e infine immerse nei pozzetti della fila H, contenenti il substrato cromogeno.

Dopo incubazione, gli elementi sporgenti vengono estratti e si procede alla lettura spettrofotometrica della D. O. della soluzione nei pozzetti della fila H della micropiastra attraverso lettore ELISA.

5. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI - La D.O. rilevata sarà inversamente proporzionale alla quantità di linfociti presenti nel campione ematico, rispettivamente cooperanti (CD4) o citotossici (CD8), per il corrispettivo aptene; l'interpretazione dei risultati del test va fatta in relazione alla D. O. rilevata in corrispondenza degli elementi sporgenti che, in assenza di linfociti competitori nel pozzetto di forma allungata, legano la massima quantità di ciascun aptene, mentre gli altri elementi sporgenti fungono da controllo negativo interno a ciascun pozzetto di forma allungata .

Il controllo positivo va allestito parallelamente utilizzando linfociti sensibilizzati che, se opportunamente dosati, consentono di ottenere una curva di taratura utile per l'interpretazione quantitativa dei risultati analitici.

Per entrambi i sistemi diagnostici illustrati, relativi all'uomo e al bovino, i kit pronti all'uso per più campioni devono comprendere:

- microstrip con 3 pozzetti di forma allungata , ognuno dei quali è in grado di accogliere 4 elementi sporgenti 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 coniugati con biotina;
- dispositivi a 12 elementi sporgenti sensibilizzati come sopra descritto per ciascun tipo di diagnosi;
- micropiastre standard a 96 pozzetti non immunoadsorbenti o un numero sufficiente di microstrip standard a 12 pozzetti non immunoadsorbenti, pre-riempite con coniugato;
- micropiastre standard a 96 pozzetti non immunoadsorbenti o un numero sufficiente di microstrip standard a 12 pozzetti non immunoadsorbenti, pre-riempite con substrato cromogeno;

- eventuali micropiastre standard a 96 pozetti non immunoadsorbenti o un numero sufficiente di microstrip standard a 12 pozetti non immunoadsorbenti, pre-riempiti con soluzione di lavaggio, o, alternativamente, flaconi con soluzione di lavaggio dotati di erogatore;
- tamponi di carta bibula per l'asciugatura degli elementi;
- supporto per contenere e muovere contemporaneamente i dispositivi a 12 elementi sporgenti, descritto nei sopra citati brevetti EP 1 499 894 B1, USPTO 7,510,687, SIPO PCR ZL 03 8 10029.0 e PCT WO/2003/085401 del 16.10.2003, dai quali la presente invenzione deriva.

L'esecuzione manuale dei test prevede che, dopo l'incubazione dei campioni ematici nei pozetti di forma allungata e il lavaggio di questi ultimi, in ciascuno di essi vada inoculato il mix standardizzato di antigeni di micobatteri prescelto e venga posizionato il supporto contenente 8 dispositivi a 12 elementi sporgenti sensibilizzati, che consente di spostare contemporaneamente i dispositivi stessi, in modo che i loro elementi sporgenti siano: - immersi nei pozetti di forma allungata e poste ad incubare; - lavate e asciugate; - immerse nei pozetti standard contenenti il coniugato e poste ad incubare; - lavate e asciugate; - immerse nei pozetti standard contenenti il substrato cromogeno e poste ad incubare; - estratte per la lettura mediante lettore ELISA di questi ultimi pozetti, nei quali si sviluppata la reazione cromogena.

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

### **Breve descrizione delle figure**

In figura 1 è schematizzata una microstrip a 3 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 4 elementi.

In figura 2 è schematizzata una microstrip a 4 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 3 elementi.

In figura 3 è schematizzata una microstrip a 2 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 6 elementi.

In figura 4 è schematizzata una microstrip a 2 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 4 elementi.

In figura 5 è schematizzata una micropiastra a 24 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 4 elementi.

In figura 6 è schematizzata una micropiastra a 32 pozetti di forma allungata idonei ad accogliere 3 elementi.

### **Forme di realizzazione dell'invenzione**

In Figura 1 è rappresentato un esempio di microstrip a 3 pozetti di forma allungata per 4 elementi, per la predisposizione di kit pronti all'uso per diagnosi rapida di tubercolosi, basata sul rilevamento quantitativo e simultaneo di differenti marker linfocitari mediante competizione tra 2 fasi solide. La microstrip (11) a 3 pozetti allungati ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti; ogni pozzetto allungato (10) è idoneo ad accogliere 4 elementi (12) del dispositivo (13) con 12 elementi sporgenti da un'asta a distanza modulare coincidente con la distanza modulare dei pozetti di micropiastre o microstrip standard.

In Figura 2 è rappresentato un esempio di microstrip a 4 pozetti di forma allungata per 3 elementi, per la predisposizione di kit pronti all'uso per il rilevamento quantitativo e simultaneo di differenti marker mediante competizione tra 2 fasi solide. La microstrip (21) ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti; ogni pozzetto allungato (20) è idoneo ad accogliere 3 elementi (22) del dispositivo (23).

In Figura 3 è rappresentato un esempio di microstrip a 2 pozetti di forma allungata per 6 elementi, per la predisposizione di kit pronti all'uso per il rilevamento quantitativo e simultaneo di differenti marker mediante competizione tra 2 fasi solide. La microstrip (31) a 2 pozetti allungati per 6 elementi ha dimensione di una microstrip standard a 12 pozetti; ogni pozzetto allungato (30) è idoneo ad accogliere 6 elementi (32) del dispositivo (33).

In Figura 4 è rappresentato un esempio di microstrip a 2 pozetti di forma allungata per 4 elementi, per la predisposizione di kit pronti all'uso per il rilevamento quantitativo

e simultaneo di differenti marker mediante competizione tra 2 fasi solide. La microstrip (41) a 2 pozetti allungati per 4 elementi ha dimensione di una microstrip standard a 8 pozetti; ogni pozetto allungato (40) è idoneo ad accogliere 4 elementi (42) del dispositivo (43).

In Figura 5 è rappresentato un esempio di micropiastra a 24 pozetti di forma allungata per 4 elementi, per la predisposizione di kit pronti all'uso per diagnosi rapida di tubercolosi, basata sul rilevamento quantitativo e simultaneo di differenti marker linfocitari mediante competizione tra 2 fasi solide. La micropiastra (51) a 24 pozetti allungati ha dimensione di una micropiastra standard a 96 pozetti; ogni pozetto allungato (50) è idoneo ad accogliere 4 elementi (52) del dispositivo (53).

In Figura 6 è rappresentato un esempio di micropiastra a 32 pozetti di forma allungata per 3 elementi (62), per la predisposizione di kit pronti all'uso per il rilevamento quantitativo e simultaneo di differenti marker mediante competizione tra 2 fasi solide. La micropiastra (61) a 32 pozetti allungati ha dimensione di una micropiastra standard a 96 pozetti; ogni pozetto allungato (60) è idoneo ad accogliere 3 elementi (62) del dispositivo (63).

**Rivendicazioni**

**1.** Metodo analitico di competizione tra 2 fasi solide per il rilevamento simultaneo di differenti marker di superficie cellulare o di differenti marker molecolari in un materiale da esaminare caratterizzato dal fatto che prevede i seguenti passi:

- a) il materiale in esame sul quale si intende rilevare la presenza di differenti marker viene immobilizzato sulla superficie di un pozzetto di forma allungata che costituisce la prima fase solida;
- b) si lava il pozzetto di forma allungata in cui è stato immobilizzato il materiale in esame;
- c) dopo il lavaggio del pozzetto di forma allungata una quantità standardizzata di mix di ligandi, ovvero di molecole ciascuna delle quali si lega specificamente ad uno dei marker da rilevare, viene inoculata nel pozzetto;
- d) in ogni pozzetto vengono immersi tre o più elementi che costituiscono la seconda fase solida su ciascuno dei quali è stato preventivamente immobilizzato uno dei marker da rilevare;
- f) durante un determinato tempo di incubazione, si instaura una reazione di competizione tra le due fasi solide per il legame dei ligandi, che possono legarsi specificamente sia ai marker del materiale immobilizzato sul pozzetto, che ai marker separatamente immobilizzati su ciascuno di detti elementi;
- g) dopo il tempo di incubazione, gli elementi vengono estratti e sottoposti a saggio immunoenzimatico o altro saggio di rilevamento quantitativo di ciascun ligando, che sarà presente su ogni rispettivo elemento in quantità inversamente proporzionale alla quantità dello stesso marker presente nel materiale in esame.

**2.** Dispositivo per l'esecuzione del metodo secondo la rivendicazione 1 costituito da microstrip o micropiastre con pozzi per la coltivazione o la fissazione di cellule o l'immunoadsorbimento di cellule o di antigeni o di anticorpi e aste con elementi sporgenti posti a distanza modulare secondo la disposizione di pozzi di micropiastre o microstrip standard, caratterizzato dal fatto che i pozzi delle microstrip o micropiastre sono di forma allungata per accogliere al loro interno 3 o 4 o 6 di detti elementi.

**3.** Dispositivo secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che le microstrip con pozzi di forma allungata hanno le dimensioni di microstrip standard a 8 pozzi e

contengono 2 pozetti di forma allungata, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 pozetti standard, e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 4 elementi.

**4.** Dispositivo secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che le microstrip con pozetti di forma allungata hanno le dimensioni di microstrip standard a 12 pozetti e contengono 3 o 4 pozetti di forma allungata, ciascuno corrispondente all'estensione di 4 o 3 pozetti standard, e ciascun pozetto di forma allungata può accogliere 4 o 3 elementi.

**5.** Dispositivo secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che le micropiastre con pozetti di forma allungata hanno le dimensioni di micropiastre standard a 96 pozetti e contengono 16 o 24 o 32 pozetti di forma allungata, ciascuno corrispondente all'estensione di 6 o 4 o 3 pozetti standard e ciascun pozetto di forma allungata accoglie 6 o 4 o 3 di detti elementi.

**6.** Dispositivo secondo la rivendicazione 3, 4 o 5 caratterizzato dal fatto che il fondo dei pozetti di forma allungata è alternativamente piatto o concavo, a ciascun formato è abbinata una superficie interna del fondo del pozetto che sia alternativamente liscia oppure ondulata, per offrire una maggiore area per l'immobilizzazione del materiale da sottoporre ad analisi.

**7.** Kit pronti all'uso per la diagnosi rapida di tubercolosi umana e per la diagnosi rapida di tubercolosi bovina abbinata alla diagnosi di paratubercolosi in stadio precoce, utilizzante il metodo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che comprende:

- microstrip con 3 pozetti di forma allungata, ognuno dei quali è in grado di accogliere 4 elementi sensibilizzati; il primo pozetto 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 pozetto di forma allungata è sensibilizzato con anticorpi anti CD8 per l'immobilizzazione dei linfociti T citolitici presenti nello stesso campione ematico; un terzo pozetto 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 sui linfociti sensibilizzati dall'infezione di micobatteri;
- micropiastre standard a 96 pozzi con 8 file da 12 pozzi ciascuna, identificate rispettivamente con le lettere da A, B, C, D, E, F, G ed H, non immunoadsorbenti pre-riempiti con: soluzione di lavaggio, coniugato e substrato cromogeno;
- tamponi di carta bibula.

**8.** Kit pronto all'uso secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che i pozzi delle micropiastre standard a 96 pozzi non immunoadsorbenti sono pre-riempiti con:

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

**9.** Kit pronti all'uso secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto che i pozzi di una micropiastra standard a 96 pozzi non immunoadsorbenti sono pre-riempiti con coniugato e i pozzi di una micropiastra standard a 96 pozzi non immunoadsorbenti sono pre-riempiti con substrato cromogeno.

Fig. 1

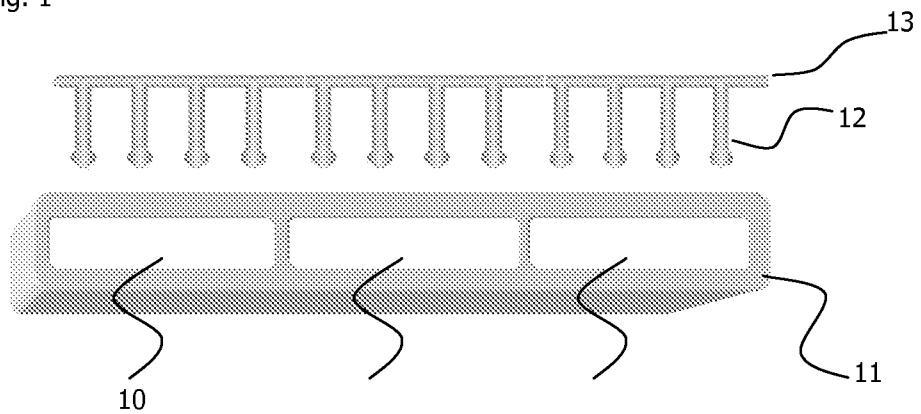


Fig. 2

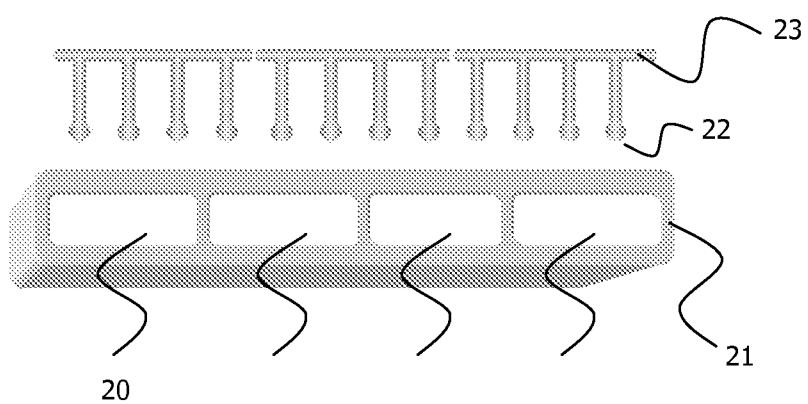


Fig. 3

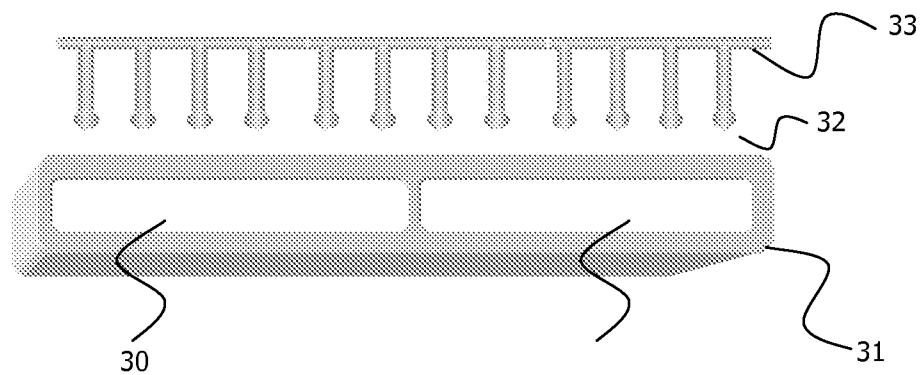


Fig. 4

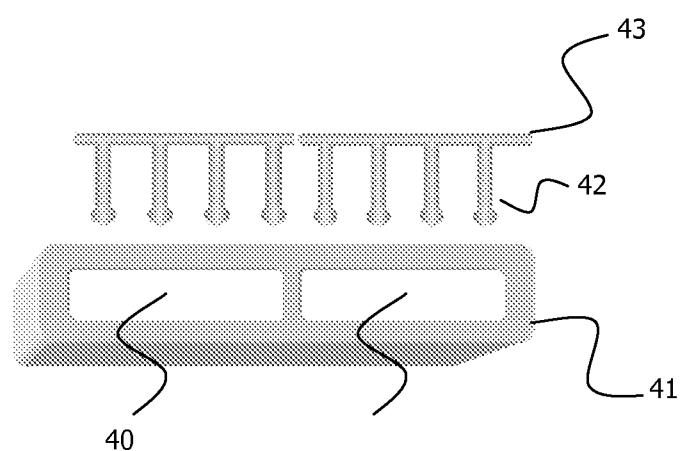


Fig. 5

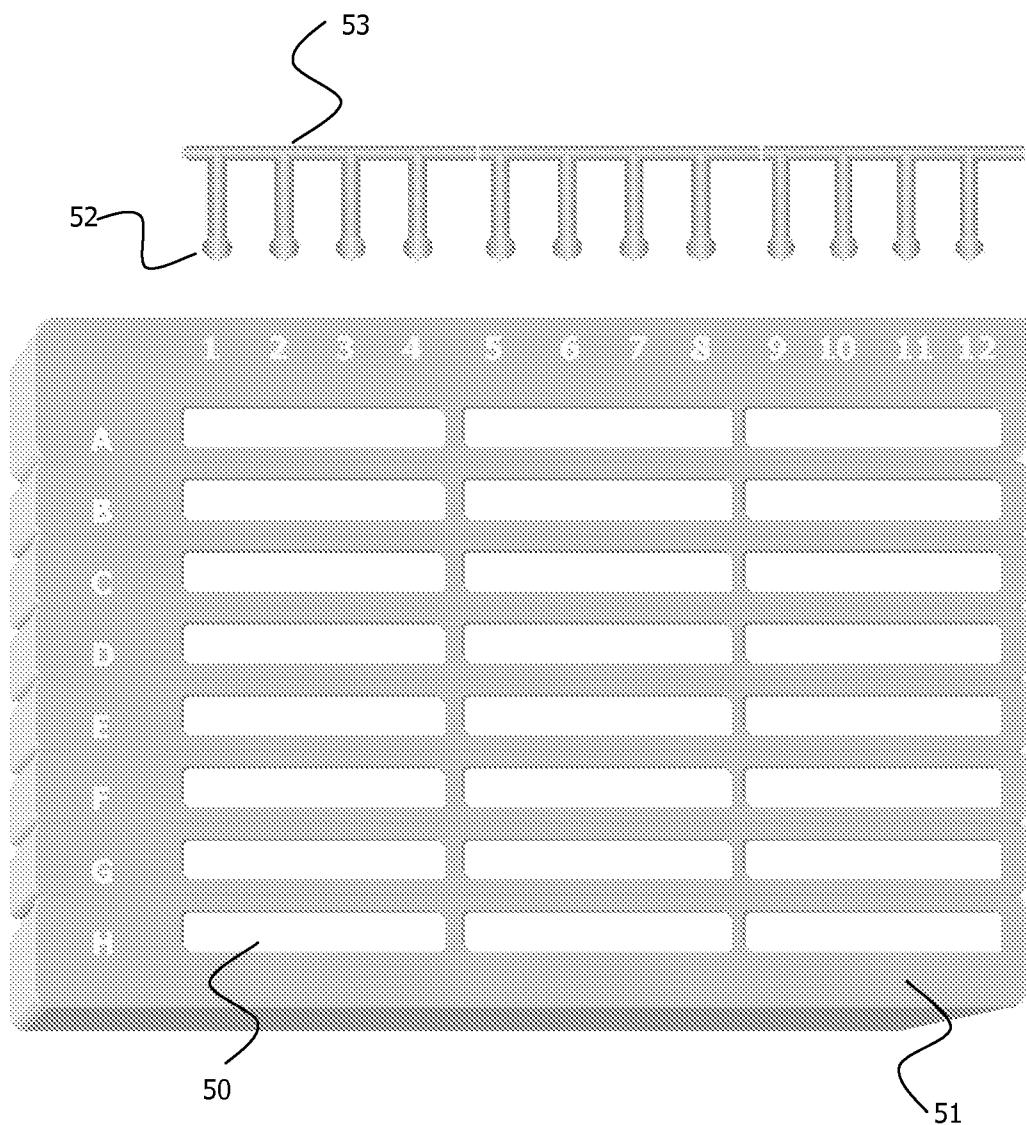


Fig. 6

