

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 216**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2010 E 10754536 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2464454**

54 Título: **Dispositivo de prueba**

30 Prioridad:

11.08.2009 GB 0914001

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2015

73 Titular/es:

**WORLDWIDE PRODUCT SOURCING LIMITED
(100.0%)**

**Bentinck House, Bentinck Road
West Drayton, Middlesex UB7 7RQ, GB**

72 Inventor/es:

BENSON, JENNIFER MARY

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 545 216 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de prueba.

5 La presente invención se refiere a dispositivos para realizar ensayos químicos y bioquímicos, particularmente para fines médicos/sanitarios. Más particularmente, pero no exclusivamente, se refiere a dispositivos para realizar pruebas de embarazo, especialmente dispositivos para utilización no profesional.

10 Las mujeres saben bien cómo determinar si están embarazadas utilizando dispositivos de prueba especializados destinados a la utilización personal sin la asistencia de profesionales médicos (tales dispositivos se conocen generalmente como kits de prueba de embarazo domésticos). Estos dispositivos se basan habitualmente en un inmunoensayo bioquímico, que somete a prueba la presencia de niveles elevados de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en fluidos corporales, tales como orina. La hormona hCG se genera desde estadios muy tempranos del embarazo, y por tanto es una especie indicadora muy útil. El inmunoensayo se basa generalmente en la utilización de anticuerpos frente a hCG y de antígenos adaptados para acoplarse con tales anticuerpos, en sitios de unión en el anticuerpo conocidos como epítomos.

20 Los dispositivos de prueba de embarazo disponibles por primera vez se basaban en la permeación de la orina a lo largo de una tira de prueba de papel o un material similar. Se encuentra primero con un depósito de anticuerpos frente a hCG unidos a un material particulado coloreado (tal como oro coloidal o látex pigmentado). Si está presente hCG, los anticuerpos se acoplan a la misma, formando un complejo que se porta a lo largo de la tira de prueba. También a lo largo de la tira de prueba hay una zona lineal transversal de un reactivo anclado al que se unirá el complejo hCG/anticuerpo. Por tanto, si está presente hCG en la orina, el complejo hCG/anticuerpo y el material coloreado asociado se acumularán en esta zona, formando una línea de color visible a través de la tira de prueba.

25 Este enfoque se utiliza ampliamente, pero ha conducido a algunos problemas en la práctica. En los estadios muy tempranos del embarazo, los niveles de hCG son relativamente bajos y la línea coloreada puede que sea débil. Esto puede conducir a resultados tanto falsos positivos como falsos negativos (las revisiones han indicado una precisión mejor del 97% cuando se utilizan por técnicos experimentados, pero de tan solo el 75% cuando se utilizan por el público general). Algunas usuarias aparentemente presentan dificultades para interpretar la presencia de una línea, incluso cuando los niveles de hCG son altos.

35 Por tanto, un enfoque alternativo ha sido medir los niveles de hCG/anticuerpo electrónicamente (por ejemplo mediante colorimetría), y utilizar los niveles medidos para desencadenar mensajes verbales en una pantalla de presentación, tal como "Embarazada" o "No embarazada". Estos dispositivos eliminan gran parte del error humano del procedimiento, pero son más caros, debido a la necesidad de proporcionar un sistema de sensor, un chip de control, una pantalla de presentación (por ejemplo una pantalla LCD) y una fuente de alimentación. Adicionalmente, estos componentes no son prácticos ni económicos de reciclar, aunque no se degradarán en vertederos u otras rutas de eliminación de residuos.

40 Por tanto, sería beneficioso si los dispositivos de prueba pudieran producirse de manera que dieran resultados definitivos de manera similar pero sin requerir componentes caros y no respetuosos con el medio ambiente.

45 Cada año se producen, se utilizan y se desechan diez millones de kits de prueba de embarazo domésticos. Por tanto, hay significativos problemas de eliminación de residuos con todas las formas actuales de dispositivos de prueba de embarazo, incluso los tipos no electrónicos.

50 Otra cuestión es la higiene. En la actualidad, es necesario sumergir un extremo del dispositivo de prueba en una muestra de orina conservada, o más habitualmente la usuaria orina directamente sobre el extremo del dispositivo de prueba. En cada caso, la usuaria debe volver a colocar una tapa de plástico sobre el extremo empapado en orina del dispositivo de prueba. Estas tapas constituyen un ajuste perfecto para evitar la fuga, pero si la usuaria no es completamente cuidadosa al volver a colocar la tapa, y toca inadvertidamente el extremo empapado en orina de la tira de prueba, o si la usuaria coloca el dispositivo de prueba utilizado sobre una superficie no esterilizada antes de volver a colocar la tapa, puede producirse contaminación cruzada, lo que puede afectar al resultado de la prueba. Esto también es un problema que requiere atención.

60 La solicitud de patente US n.º 2008/286879 da a conocer un dispositivo de prueba de embarazo realizado de fibras de celulosa comprimidas (cartón), que en utilización se hace flotar en una cantidad de orina en una taza de inodoro, y que se disgrega en algunos minutos, eliminándose luego por el inodoro.

Aunque el análisis anterior se expresa en lo que se refiere a una prueba de embarazo, ahora hay una amplia variedad de pruebas de ensayo similares adicionales para una variedad de estados médicos, que funcionan basándose en el principio del inmunoensayo para someter a prueba orina, sangre u otros fluidos corporales. En cada caso, también se aplicarán los problemas anteriores con la presentación precisa y clara de los resultados, y con la eliminación de los dispositivos de prueba utilizados.

Para las pruebas de inmunoensayo para estados graves tales como VIH/SIDA, el desbordamiento de los fluidos de prueba podría ser particularmente indeseable y peligroso. No obstante, se requerirá que los dispositivos de prueba para tales estados puedan utilizarse en condiciones no de laboratorio, no ideales, particularmente en los países en vías de desarrollo.

5 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de prueba de inmunoensayo, particularmente un dispositivo de prueba de embarazo, que evite algunos o todos los inconvenientes anteriores de los dispositivos existentes.

10 Según la presente invención, se proporciona un dispositivo de prueba de inmunoensayo que comprende unos medios de prueba de inmunoensayo montados sobre unos medios de estructura, comprendiendo dichos medios de estructura medios de cubierta adaptados para encerrar los medios de prueba de inmunoensayo, caracterizado porque los medios de cubierta comprenden un material de plástico oxobiodegradable, adaptado de tal manera que su degradación se inicie mediante la reacción con oxígeno.

15 De manera preferible, sustancialmente todos los medios de estructura del dispositivo comprenden dicho material de plástico oxobiodegradable.

20 El material de plástico oxobiodegradable puede estar adaptado para que su degradación se inicie mediante la reacción tanto con oxígeno como con agua.

Ventajosamente, el material de plástico oxobiodegradable está adaptado para completar su degradación en el medio ambiente con acción microbológica.

25 Opcionalmente, el material de plástico oxobiodegradable también está adaptado para completar su degradación en el medio ambiente sin acción microbológica, por ejemplo mediante oxidación aérea únicamente.

Alternativamente, el material de plástico oxobiodegradable puede comprender un material de plástico lleno de partículas de un material más fácilmente biodegradable.

30 Said material fácilmente biodegradable puede comprender un material polimérico que se produce de manera natural, tal como almidón.

Preferentemente, el material de plástico oxobiodegradable comprende un polímero de poliolefina.

35 Dicho polímero de poliolefina puede comprender polietileno y/o polipropileno.

El material de plástico oxobiodegradable comprende preferentemente un material de plástico mezclado con un aditivo adaptado para promover la degradación oxidativa del material de plástico.

40 Dicha degradación oxidativa puede comprender escisión oxidativa de moléculas de polímero de cadena larga dentro del material de plástico.

45 La escisión de dichas moléculas de polímero de cadena larga puede producir por tanto fragmentos de cadena suficientemente cortos como para ser atacados y degradados adicionalmente por microorganismos.

50 La escisión oxidativa de dichas moléculas de polímero de cadena larga también puede generar grupos químicos polares en las moléculas o fragmentos de las mismas, aumentando la humectabilidad del material de plástico por agua y/o promoviendo el crecimiento de biopelícula sobre el material de plástico. Preferentemente, dicho aditivo para promover la degradación oxidativa comprende al menos una sal de metal, opcionalmente por lo menos un carboxilato de metal.

55 Ventajosamente, dicho aditivo para promover la degradación oxidativa comprende un material hidrocarbonado de cadena larga, opcionalmente derivado de residuos de refino del petróleo.

Dichos dispositivo de prueba de inmunoensayo puede comprender un dispositivo de prueba de embarazo.

60 En una primera forma de realización preferida de la presente invención, dicho dispositivo de prueba de inmunoensayo comprende medios de prueba de inmunoensayo y medios de cubierta, en el que los medios de prueba pueden desplazarse selectivamente entre una primera disposición que se extiende hacia fuera desde los medios de cubierta y una segunda disposición sustancialmente encerrada dentro de los medios de cubierta.

Preferentemente, los medios de prueba pueden deslizarse entre dichas dos disposiciones.

65 Ventajosamente, los medios de prueba están adaptados para alojar una muestra que va a someterse a prueba en la primera disposición y para la prueba de inmunoensayo que va a llevarse a cabo en la segunda disposición.

Los medios de prueba pueden comprender un cuerpo alargado que puede desplazarse generalmente a lo largo de su eje longitudinal.

5 Los medios de prueba pueden desplazarse manualmente entre dichas dos disposiciones.

Opcionalmente, el dispositivo está dotado de medios de desplazamiento manual, alejados de pero conectados de manera operativa directa o indirectamente a los medios de prueba.

10 Los medios de cubierta están dotados preferentemente de medios de ventana que permiten la observación de los medios de prueba en dicha segunda disposición.

El dispositivo de prueba de inmunoensayo puede comprender un dispositivo de prueba de embarazo.

15 En una segunda forma de realización preferida de la presente invención, dicho dispositivo de prueba de inmunoensayo comprende medios de prueba de inmunoensayo, en el que dichos medios de prueba están adaptados para producir, como indicación de un resultado de prueba positivo, un cambio de color que se extiende a través de una zona bidimensional del material de prueba.

20 Preferentemente; el dispositivo de prueba comprende medios de cubierta dotados de medios de ventana que permiten la observación de dicha zona bidimensional.

Preferentemente, dicha zona bidimensional comprende regiones tratadas para no experimentar dicho cambio de color en caso de un resultado positivo.

25 Dicho tratamiento puede comprender imprimir sobre dichas regiones una composición hidrófuga.

Dicho tratamiento puede comprender la omisión de dichas regiones de un material necesario para dicho cambio de color, o imprimir sobre las mismas un reactivo para inactivar dicho material.

30 Dicho tratamiento puede comprender imprimir sobre dichas regiones un agente que contrasta con el resto de la zona bidimensional tras un resultado de prueba positivo.

35 Dichas regiones pueden formar marcas, de manera que las marcas se harán visibles debido al cambio de color en el resto de la zona fuera de dichas regiones.

Dicho cambio de color puede deberse a una especie coloreada que migra desde el exterior de la zona quedando inmovilizada en dicha zona.

40 Dicho cambio de color puede deberse a una reacción de producción de color entre una primera especie que migra desde el exterior de la zona y una segunda especie presente en la zona.

El dispositivo puede estar dotado de una pluralidad de dichas zonas del material de prueba.

45 El dispositivo de prueba de inmunoensayo puede comprender un dispositivo de prueba de embarazo.

En todas las formas de realización, dicho dispositivo comprende preferentemente dos medios de prueba de inmunoensayo.

50 Ventajosamente, un primero de dichos medios de prueba de inmunoensayo está adaptado para indicar un resultado positivo y un segundo de dichos medios de prueba de inmunoensayo está adaptado para indicar un resultado negativo.

55 Ahora se describirán más particularmente las formas de realización de la presente invención a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 es una elevación frontal de un primer dispositivo de ensayo que realiza la presente invención, con sus paneles de prueba extendidos;

60 la figura 2 es una elevación frontal del dispositivo de ensayo mostrado en la figura 1, con sus paneles de prueba replegados;

la figura 3 es una elevación frontal de un conjunto de paneles de prueba separado del dispositivo de ensayo mostrado en la figura 1;

65 la figura 4 es una elevación frontal de una cubierta del dispositivo de ensayo mostrado en la figura 1;

la figura 5 es una vista en perspectiva del dispositivo de ensayo mostrado en la figura 1, con sus paneles de prueba extendidos;

5 la figura 6 es una elevación frontal de un conjunto de paneles de prueba de un segundo dispositivo de ensayo que realiza la presente invención, separados del mismo;

la figura 7 es una elevación frontal del dispositivo de ensayo de la figura 6, tras un resultado de prueba positivo;

10 la figura 8 es una elevación frontal del dispositivo de ensayo de la figura 6, tras un resultado de prueba negativo;

la figura 9 es una elevación frontal de un tercer dispositivo de ensayo, tras un resultado de prueba positivo; y

15 la figura 10 es una elevación frontal del dispositivo de ensayo de la figura 9, tras un resultado de prueba negativo.

En referencia ahora a las figuras y a las figuras 1 y 2 en particular, se muestra un dispositivo de ensayo 1 que realiza la presente invención. La invención se describirá a continuación principalmente en lo que se refiere a sus formas de realización que comprenden kits de prueba de embarazo domésticos, pero el dispositivo de ensayo 1 mostrado es igualmente adecuado para una variedad de otros ensayos y pruebas químicas y (particularmente) bioquímicas.

20 El dispositivo de ensayo 1 comprende una cubierta 2 que presenta una forma rectangular delgada, alargada (véase también la figura 5 para una vista global de su forma). Una ranura 3 longitudinal discurre a lo largo de una cara frontal del dispositivo de ensayo 1, desde adyacente a un primer extremo de la cubierta 2 hasta adyacente a un punto medio de la misma. Un deslizador 4 que puede hacerse funcionar manualmente está limitado a desplazarse a lo largo de la ranura 3. El deslizador 4 está montado en un primer extremo de un brazo 5 de pistón alargado, que por tanto también puede moverse longitudinalmente.

25 Una ventana 6 rectangular está formada en la cara frontal de la cubierta 2, dispuesta entre la ranura 3 y un segundo extremo de la cubierta 2 alejado del primero. La ventana 6 puede comprender una única abertura en la cubierta 2, o puede estar cubierta por un panel de visión transparente. Opcionalmente, este panel transparente puede estar perfilado para ampliar la vista de un usuario del interior de la cubierta 2 detrás de la ventana 6.

30 En esta forma de realización particular, un primer panel de prueba alargado 7 y un segundo panel de prueba alargado 8 están montados cada uno en un extremo proximal a un segundo extremo del brazo 5 de pistón alejado del deslizador 4, extendiéndose cada panel de prueba 7, 8 uno al lado del otro longitudinalmente del dispositivo 1. Cada panel de prueba 7, 8 comprende un sustrato delgado, poroso (normalmente una forma de papel) soportado sobre una placa de soporte rígida. Una tapa 9 de extremo transversal conecta un extremo distal de cada panel de prueba 7, 8 (nota: para algunos ensayos, puede ser suficiente un único panel de prueba).

35 Tal como se muestra en la figura 3, una barra 10 transversal (oculta en las figuras 1 y 2) conecta los extremos proximales de los paneles de prueba 7, 8 al brazo 5 de pistón. Todo el conjunto mostrado en la figura 3 puede moverse por tanto longitudinalmente como una unidad mediante el movimiento manual del deslizador 4.

40 La figura 4 muestra la cubierta 2 en más detalle. En la mayoría de las formas de realización, la cubierta 2 comprende dos molduras que pueden funcionar conjuntamente, que se ensamblan para formar una envuelta hueca. Si se desea, puede proporcionarse un cuerpo parcialmente sólido en lugar de tal moldura hueca. La cubierta 2, el deslizador 4, el brazo 5 de pistón, el soporte para los paneles de prueba 7, 8 y la mayoría de las otras partes del dispositivo de ensayo 1 están moldeadas a partir de material de plástico, idealmente una poliolefina tal como polietileno o polipropileno. Este material de plástico se modifica para que sea biodegradable, tal como se describe en más detalle más adelante.

45 La cubierta 2 puede comprender un conducto 11 interno que une la ranura 3 y la ventana 6, estando configurado el conducto 11 para alojar y guiar el brazo 5 de pistón. Alternativamente, pueden proporcionarse carriles de guía, pares de rodillos, pares de varillas de guía u otras características de este tipo dentro de la cubierta 2, para garantizar que el brazo 5 de pistón (y todo lo que esté unido al mismo) se desplace de manera esencialmente longitudinal.

50 En el segundo extremo de la cubierta 2, un par de aberturas 12, 13 se extienden a través de la cubierta 2, estando configuradas para alojar y guiar un panel de prueba 7, 8 respectivo. Alternativamente, puede proporcionarse una única abertura, a través de la cual pasan ambos paneles de prueba 7, 8. Puede proporcionarse un rebaje 14 en la cubierta 2 para alojar la tapa 9 de extremo.

55 En una disposición alternativa (no mostrada), el brazo 5 de pistón se extiende hacia fuera desde el primer extremo de la cubierta 2 y termina en un pulsador, formando por tanto una estructura que se asemeja al émbolo de una jeringa. Este dispositivo de ensayo se asemeja por lo demás al mostrado en las figuras 1 a 4, aparte de no requerir una ranura 3 para contener un deslizador 4.

60

El dispositivo de ensayo 1 presenta por tanto dos configuraciones seleccionables, tal como se muestra en las figuras 1 y 2 respectivamente. Se almacena en la configuración de la figura 2, con el deslizador 4 en el primer extremo de la ranura 3, manteniéndose el brazo 5 de pistón dentro de la ranura 3, y manteniéndose los paneles de prueba 7, 8 dentro de la cubierta 2, detrás de la ventana 6. El segundo extremo de la cubierta se cierra por la tapa 9 de extremo (que idealmente se asienta de manera estanca en el rebaje 14).

Para su utilización, el deslizador 4 se mueve hacia abajo por la ranura 3, desplazándose el brazo 5 de pistón al interior de la parte de la cubierta 2 detrás de la ventana 6, y sobresaliendo los paneles de prueba 7, 8 longitudinalmente de la cubierta 2, tal como se muestra en la figura 1. En esta configuración, una muestra de prueba líquida (por ejemplo la orina de una usuaria para una prueba de embarazo) puede verterse o proyectarse sobre los paneles de prueba 7, 8, o los paneles de prueba 7, 8 pueden sumergirse en un depósito de una muestra de prueba líquida.

Una vez que se ha administrado de este modo la muestra de prueba a los paneles de prueba 7, 8, se hace volver el deslizador 4 al primer extremo de la ranura 3, retirando los paneles de prueba 7, 8 al interior de la cubierta 2 (es decir volviendo a la configuración de la figura 2). Las reacciones de prueba relevantes en los paneles de prueba 7, 8 (véase más adelante) pueden observarse a través de la ventana 6.

Un beneficio principal de esta disposición es la higiene. Los dispositivos de ensayo convencionales, tales como kits de prueba de embarazo domésticos, habitualmente implican que una usuaria orine sobre una parte de extremo expuesta de manera permanente de un panel de prueba, o que sumerja este panel de prueba en orina. Es muy fácil que la orina se desvíe hacia la cubierta de un dispositivo convencional, lo que conduce a la contaminación consiguiente de los dedos de la usuaria y/o la zona circundante mientras se realiza la prueba. Incluso hay mayores peligros potenciales cuando están sometiendo a prueba otros fluidos corporales, tales como sangre, particularmente cuando la prueba es para una enfermedad infecciosa.

Los paneles de prueba 7, 8 que se extienden desde el dispositivo de ensayo 1 de la presente invención hacen que sea mucho más fácil aplicar una muestra de prueba líquida a los paneles de prueba 7, 8 únicamente. Cuando los paneles de prueba 7, 8 están replegados dentro de la cubierta 2, una muestra de prueba potencialmente peligrosa aplicada a los paneles 7, 8 se mantiene de manera segura dentro de la cubierta 2 (especialmente cuando la ventana 6 presenta un vidrio y la tapa 9 de extremo se asienta de manera estanca en un rebaje 14). El peor caso posible con una disposición de este tipo sería que hubiera una cantidad muy pequeña de contaminación en el exterior de la tapa 9 de extremo, y esto, además, podría evitarse mediante un rebaje 14 más profundo dentro del cual retirar la tapa 9 de extremo completamente.

La reacción de prueba real puede seleccionarse de una variedad de sistemas de prueba conocidos, dependiendo del analito que va a someterse a ensayo. Una clase utilizada comúnmente de sistemas de prueba se denomina generalmente "pruebas de flujo lateral". Una muestra de prueba líquida fluye a través de un sustrato poroso, habitualmente por acción capilar. En primer lugar se encuentra con un depósito de un material coloreado, que se arrastra al interior de la muestra líquida que fluye. El material coloreado (normalmente un material particulado, tal como oro coloidal o un látex pigmentado) habitualmente está pretratado de modo que el analito particular se una al material coloreado. Por ejemplo, anticuerpos específicos frente al analito pueden unirse al material coloreado, de modo que el analito a su vez se una a través de los anticuerpos al material coloreado. En ausencia del analito particular, el material coloreado se arrastra simplemente con la muestra de prueba.

La muestra de prueba entra entonces en una zona de detección, en la que hay un reactivo anclado que también se une al analito. El analito y el material coloreado unido al mismo se inmovilizan por tanto en esta zona de detección, donde la acumulación de material coloreado produce una indicación visual de la presencia del analito en la muestra de prueba. Si el analito no está presente, el material coloreado no se captura por el reactivo anclado, y continúa en suspensión en la muestra de prueba, fuera de la zona de detección.

Esta disposición se utiliza de manera convencional en pruebas de embarazo, tal como se describe en la sección de introducción anteriormente. El analito sometido a ensayo es entonces hCG (gonadotropina coriónica humana).

Sin embargo, ésta no es la única disposición en la que pueden utilizarse reacciones de analito/anticuerpo para producir una presentación visual de la presencia del analito. El término general para tales sistemas que se basan en reacciones de analito/anticuerpo es ELISA, o "ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas". Está disponible una amplia variedad de sistemas de ELISA. Por ejemplo, en algunos sistemas, el material coloreado sólo podría liberarse del sustrato si el analito está presente. Por tanto, el material coloreado sólo pasa hacia delante en la muestra de prueba hacia la zona de detección, si el analito está presente. La zona de detección puede contener entonces un reactivo anclado adaptado para inmovilizar el material coloreado directamente, en lugar de uno adaptado para inmovilizar el analito.

Otro enfoque es emplear un sistema indicador de color de dos componentes, arrastrándose un precursor de colorante incoloro en la muestra de prueba en la zona de depósito cuando el analito está presente. Entonces se dota a la zona de detección de un reactivo que reacciona con el precursor de colorante para formar un producto

coloreado. Alternativamente, el precursor puede ser de un color diferente al del colorante o pigmento generado en la zona de detector, y/o el colorante/pigmento generado puede ser un tono más intenso que el precursor. En cada caso, se utiliza una interacción entre el analito y un anticuerpo para el analito para liberar el precursor de colorante, para capturar el precursor de colorante en la zona de detección, o ambos.

5 Se observará que el dispositivo de ensayo 1 descrito anteriormente presenta dos paneles de prueba 7, 8. Una cuestión frecuente con tales pruebas que se basan en un cambio de color en una zona de detección es que bajos niveles de analito (por ejemplo bajos niveles de hCG en los estadios tempranos del embarazo) pueden conducir a resultados poco claros. Por tanto, puede ser muy beneficioso proporcionar un elemento de comparación para
10 mostrar qué aspecto debería presentar un resultado positivo. De manera convencional, frecuentemente esto adopta la forma de un sistema en el que se libera un material coloreado de un depósito y entonces se inmoviliza en una zona de detección, independientemente de la presencia o ausencia de un analito especificado. De manera conveniente, el sistema de prueba real está en un panel de prueba, y el elemento de comparación en el otro. Sin embargo, en algunas formas de realización de la presente invención, el segundo panel de prueba se utiliza de
15 manera alternativa, tal como se describe más adelante.

Tal como se describe en la sección de introducción, cuando se utiliza una prueba de ensayo, tal como un kit de prueba de embarazo doméstico, sin supervisión profesional, es sorprendentemente común la mala interpretación de los resultados de prueba. Unidades de prueba electrónicas pueden medir un cambio de color y por consiguiente
20 mostrar indicaciones de “Embarazada” o “No embarazada” en una pantalla de presentación. Sin embargo, estas unidades son complejas, caras, utilizan recursos valiosos y son difíciles o imposibles de reciclar tras su utilización, y por tanto se consideran ecológicamente poco seguras.

En lugar de producir una línea delgada en una zona de detector, como para los kits de prueba de embarazo domésticos convencionales, en las formas de realización de la presente invención, se utiliza un sistema de ensayo que conduce a un cambio de color significativo sobre una zona amplia. Por tanto, tal como se muestra en la figura 2, se desarrollará una zona coloreada bidimensional sobre la mayor parte o la totalidad de un panel de prueba 7, una vez que el ensayo/reacción de prueba está completo.

30 Tal como hizo referencia anteriormente, el otro panel de prueba 8 todavía podría utilizarse para una reacción modelo, sin requerir la presencia del analito (tal como hCG), con el fin de indicar cómo debería aparecer un resultado positivo en el primer panel de prueba 7.

Alternativamente, sin embargo, podría utilizarse un sistema de generación de color diferente, que sólo desarrolla un cambio de color en el segundo panel de prueba 8, en ausencia del analito (por ejemplo hCG). Por ejemplo, el analito podría unirse a anticuerpos en el material coloreado/precursor de colorante y el sustrato en el depósito, evitando que el material coloreado/precursor de colorante salga del depósito y pase a la zona de detección. Sin embargo, si el analito no está presente, el material coloreado/precursor de colorante se arrastra en la muestra de prueba líquida, pasa a la zona de detección, y allí produce un cambio de color.

40 Por tanto, habría un primer cambio de color definido en un panel de prueba 7 si el analito está presente, y un segundo cambio de color definido en el otro panel de prueba 8 si el analito no está presente. Esto debe ser más fácil de leer.

45 Un desarrollo adicional de la presente invención, que proporciona incluso indicaciones más inconfundibles de resultados de prueba positivos y negativos, se ilustra en las figuras 6 y 7. En esta forma de realización, se forman marcas 15, 16 en uno o ambos paneles de prueba 7, 8, que sólo se muestran en el caso de un resultado de prueba positivo, o sólo se muestran en el caso de un resultado de prueba negativo, respectivamente.

50 Tal como se muestra en la figura 6, se proporcionan mensajes alternativos en cada panel de prueba 7, 8, utilizando marcas 15, 16 apropiadas. Podrían utilizarse símbolos o logos (particularmente si se pretende la utilización del dispositivo en regiones de baja alfabetización). Sin embargo, se cree que es probable que las indicaciones verbales sean más inconfundibles. En este caso, se utilizan las palabras “POSITIVO” y “NEGATIVO”; para una prueba de embarazo podrían utilizarse “EMBARAZADA” y “NO EMBARAZADA”; los términos sencillos “SÍ” y “NO” serían
55 igualmente viables.

En una primera variante de esta forma de realización, las marcas 15, 16 podrían formarse en los paneles de prueba 7, 8 respectivos, imprimiendo con el reactivo apropiado adaptado para inmovilizar un complejo de analito/material coloreado. Alternativamente, cuando está utilizándose un sistema de precursor de colorante/reactivo anclado, las marcas 15, 16 podrían imprimirse sobre los paneles de prueba 7, 8 utilizando el reactivo anclado. Por tanto, en un resultado de prueba positivo, el material coloreado se reúne sólo cuando las marcas 15, 16 se han impreso con el reactivo de anclaje (o el colorante/pigmento se forma sólo cuando las marcas 15, 16 se han impreso con el reactivo anclado apropiado). Las marcas 15, 16 relevantes aparecerán por tanto sobre un fondo generalmente no coloreado del panel de prueba 7, 8.

65

5 Sin embargo, se cree que una segunda variante de esta forma de realización es incluso más fácil de leer y puede ser más sencilla de producir de manera fiable. En esta variante, se utiliza un sistema de prueba de ensayo de ELISA que produce un cambio de color sobre la mayor parte o la totalidad del panel de prueba 7, 8. Las marcas 15, 16 podrían producirse colocando una máscara sobre cada panel de prueba 7, 8 con las marcas 15, 16 impresas sobre la misma con tinta blanca; por tanto, serían invisibles antes de que se produjera una reacción, pero una vez que el panel de prueba 7, 8 ha cambiado de color tras la máscara, las marcas 15, 16 se harían más visibles. (También podría utilizarse una máscara con todo excepto las marcas impresas encima en tinta blanca).

10 Sin embargo, un enfoque más elegante y sencillo sería tratar las zonas del panel de prueba 7, 8 correspondientes a las marcas 15, 16, de manera que el cambio de color del panel de prueba 7, 8 como un todo o bien no se produzca o bien no se muestre.

15 Por tanto, las marcas 15, 16 podrían imprimirse con un reactivo activo adicional que inactive localmente una reacción de formación de color sobre el panel de prueba 7, 8, o que inactive localmente un analito/reactivo de inmovilización de material coloreado (según sea apropiado para el sistema de prueba exacto en utilización).

20 Otro enfoque sería imprimir las marcas 15, 16 sobre el papel (u otro sustrato poroso) del panel de prueba 7, 8 respectivo con una sustancia hidrófoba transparente. Esto evitará que la muestra de prueba acuosa entrase incluso en las zonas del panel de prueba 7, 8 correspondientes a las marcas 15, 16. (Las marcas 15, 16 podrían imprimirse sobre el papel con la sustancia hidrófoba, antes de que el papel se impregnara incluso de la disolución acuosa con los reactivos apropiados, combinando este concepto con el del párrafo anterior).

25 Un tercer enfoque sería imprimir las marcas 15, 16 sobre las superficies del panel de prueba 7, 8 respectivo utilizando una tinta blanca opaca. Por tanto, las marcas 15, 16 de nuevo serían indistinguibles contra el fondo no coloreado de los paneles de prueba 7, 8 antes de su utilización (o en caso de un resultado negativo). En caso de un resultado positivo, el panel de prueba 7, 8 respectivo cambiaría de color, revelando las marcas 15, 16 en blanco contra un fondo coloreado.

30 La figura 6 muestra por tanto una disposición del panel de prueba en la que un panel de prueba 7 está configurado para cambiar de color sólo en presencia de hCG, y presenta marcas 15 reveladas por un cambio de color de este tipo, confirmando que este cambio de color significa "positivo/embarazada". El segundo panel de prueba 8 está configurado para cambiar de color sólo en ausencia de niveles significativos de hCG, y presenta marcas 16 para confirmar que este cambio de color significa "negativo/no embarazada".

35 La figura 7 muestra por tanto un dispositivo de ensayo 1 que comprende la disposición del panel de prueba de la figura 6, tras completar una prueba que indica embarazo. El fondo del primer panel de prueba 7 ha cambiado de color, revelando las marcas POSITIVO 15. El fondo del segundo panel de prueba 8 permanece no coloreado, y las marcas NEGATIVO 16 permanecen invisibles.

40 La figura 8 muestra el mismo dispositivo de ensayo 1, tras completarse un resultado de prueba negativo. El fondo del segundo panel de prueba 8 ha cambiado de color, revelando las marcas NEGATIVO 16, mientras que el fondo del primer panel de prueba 7 permanece no coloreado, dejando las marcas POSITIVO 15 efectivamente invisibles.

45 Las figuras 9 y 10 muestran un tercer dispositivo de ensayo 21 que es idéntico al mostrado en las figuras 7 y 8, excepto por que presenta un primer panel de prueba 17 que porta marcas 25 que cambian de color en caso de un resultado de prueba positivo, y un segundo panel de prueba 18 que porta marcas 26 que cambian de color en caso de un resultado de prueba negativo. Los fondos de estos paneles de prueba 17, 18 no cambian de color.

50 Por tanto, la figura 9 muestra el tercer dispositivo de ensayo 21 tras haberse llevado a cabo una prueba con un resultado positivo. Las marcas POSITIVO 25 han cambiado de color contra un fondo sin cambios del primer panel de prueba 17, mientras que las marcas NEGATIVO 26 no han cambiado de color, y no son visibles contra el fondo sin cambios del segundo panel de prueba 18. A la inversa, la figura 10 muestra el dispositivo 21 tras una prueba con un resultado negativo. Las marcas NEGATIVO 26 han cambiado de color y son visibles contra un fondo sin cambios del segundo panel de prueba 18, mientras que las marcas POSITIVO 25 no han cambiado de color y no son visibles contra el fondo sin cambios del primer panel de prueba 17.

55 Nota: En las figuras 6 a 10, se muestran los contornos de las marcas 15, 16, 25, 26 por claridad, incluso cuando las marcas 15, 16, 25, 26 sean del mismo color que el fondo y efectivamente invisibles en la práctica.

60 Tal como se mencionó brevemente antes, un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un dispositivo que pueda desecharse tras su utilización sin daño medioambiental significativo. Por tanto, se prefiere si los componentes del dispositivo de ensayo 1 son todos degradables en el medio ambiente. Es probable que el papel de los paneles de prueba 7, 8 sea fácilmente degradable en fibras neutras para el medio ambiente, pero también es necesario que el resto del dispositivo de ensayo 1 esté compuesto por un material que sea duradero en almacenamiento y suficientemente fuerte para que un usuario no tenga que preocuparse por la rotura del dispositivo de ensayo 1 (que a menudo se utilizará por personas bajo estrés significativo).

La mayoría de los materiales de plástico serían adecuados, además de su resistencia a la degradación en el medio ambiente. Se han desarrollado algunos polímeros que son biodegradable en condiciones particulares, incluyendo PHB (polihidroxibutirato), PLA (poli(ácido láctico)) y PCL (policaprolactonas). Sin embargo, estos materiales son actualmente mucho más caros que las poliolefinas sencillas tales como polietileno o polipropileno. Pueden someterse a compostaje anaerobio, pero son mucho menos fáciles de descomponer en condiciones aerobias, tal como si se eliminaran de un vertedero. En muchos casos, particularmente en países en vías de desarrollo, los artículos de polímero simplemente se tiran, en lugar de llevarse a una instalación de eliminación especial. Por tanto, la degradación aerobia sería la única vía disponible. En cualquier caso, los procesos anaerobios pueden conducir a la producción de metano, que es un “gas de efecto invernadero” particularmente indeseable. Adicionalmente, no son fáciles de reciclar y sería necesario mantenerlos separados de otras corrientes de polímero reciclado, para evitar arruinar las propiedades del polímero reciclado. Algunos de estos polímeros podrían incluso reaccionar con los reactivos utilizados en el dispositivo.

El enfoque en la presente invención se conoce de manera diversa como “bioasimilación” u “oxo-biodegradación”. Un problema principal con la biodegradación de poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno, es la longitud total de las cadenas hidrocarbonadas que constituyen el polímero y que no ofrecen un punto de ataque fácil para los microorganismos. Sin embargo, si las cadenas hidrocarbonadas fueran más cortas, la poliolefina perdería su resistencia física y su rigidez. Las poliolefinas, por tanto, se biodegradan muy lentamente, a lo largo de años o décadas.

Ahora se cree que la superficie de una poliolefina se oxidará muy gradualmente en el aire, acortándose mediante esta escisión oxidativa de las cadenas hidrocarbonadas y dejando grupos de extremo polares, estimulando ambos el ataque microbiano posterior y el consumo de los fragmentos de cadena. Esta oxidación también puede fotocatalizarse mediante luz UV. Sin embargo, depender de la oxidación de superficie para degradar un objeto de poliolefina es demasiado lento.

Recientemente, se han desarrollado aditivos para poliolefinas (conocidos como “prodegradantes”) que aumentan significativamente el ataque oxidativo sobre las cadenas hidrocarbonadas. El prodegradante cataliza la oxidación aérea inicial de las cadenas hidrocarbonadas de la poliolefina y, puesto que se combina por todo el volumen de la poliolefina, este efecto no debe limitarse a la superficie de la poliolefina solo. Adicionalmente, una vez que la escisión de cadena está en marcha, la poliolefina se vuelve quebradiza y se degrada físicamente en escamas u otros cuerpos más pequeños, aumentando el área superficial para la oxidación aérea catalizada. Una cadena hidrocarbonada de polietileno típica puede presentar una masa molecular de aproximadamente 300.000 unidades, pero el prodegradante, en condiciones aerobias, puede disminuir rápidamente la masa molecular promedio hasta por debajo de 40.000 unidades.

Con esta masa molecular, los fragmentos de cadena son suficientemente pequeños para el ataque microbiológico. Adicionalmente, los grupos de extremo polares generados por la oxidación han alcanzado en esta fase una concentración suficiente como para que la poliolefina sea hidrófila, y los microorganismos pueden crecer fácilmente a través de la superficie de la poliolefina y comenzar a “comer” los fragmentos de cadena.

Desde esta fase en adelante, el proceso es un verdadero proceso de biodegradación, ya que está mediado completamente por microorganismos, que “masticarán” los fragmentos de cadena, convirtiendo el carbono y el hidrógeno en agua y biomasa, y finalmente en dióxido de carbono más agua. Este es un producto final mucho menos perjudicial que el metano procedente de la digestión anaerobia. Todo el proceso se denomina por tanto acertadamente oxo-biodegradación.

El prodegradante puede incorporarse en la poliolefina durante el procesamiento, convenientemente en forma de un concentrado o “lote maestro” que contiene altos niveles de prodegradante disperso en la poliolefina apropiada.

Actualmente se dispone de una variedad de tales prodegradantes. Por ejemplo, la empresa británica Symphony Plastics Ltd ofrece actualmente un aditivo prodegradante con la marca comercial registrada “d₂w”. La empresa estadounidense Willow Ridge Plastics, Inc ofrece prodegradantes con las marcas PDQ, PDQ-H y BDA. EPI Environmental Products Inc de Canadá ofrece un prodegradante con el nombre de marca TDPA. Wells Plastics Limited, del RU, ofrece productos de lote maestro que contienen aditivos prodegradantes con el nombre de marca “Reverte”.

Se cree que el componente común en estos aditivos es la presencia de sales de metal, y en particular sales de metal de transición. Se cree que las sales de compuestos orgánicos son las más eficaces, posiblemente debido a su fácil incorporación. Los carboxilatos de cadena larga, tales como estearatos u oleatos, o sales aromáticas tales como naftenatos, parecen ser particularmente adecuados. Las sales de carboxilato de cobalto, hierro, zinc, manganeso, cerio y níquel se han citado como componentes prodegradantes eficaces, pero se han propuesto la mayoría de los metales de transición y muchos metales no de transición como activos de manera adecuada en forma de una sal de un carboxilato u otro compuesto orgánico de este tipo.

Se sugiere que una fuente fácilmente disponible de mezclas de tales sales de metal activas es el residuo de la destilación del petróleo. En cualquier caso, se sugiere que la presencia de hidrocarburos derivados del petróleo que presentan una longitud de cadena moderadamente alta (aunque mucho menor que las longitudes de cadena de las poliolefinas) ayuda por sí misma al proceso de oxo-biodegradación.

Estos prodegradantes se han utilizado en LDPE de película delgada, tal como en bolsas. Parece haber una relación directa entre el nivel de prodegradante (es típico el 1-3% en peso del concentrado de prodegradante en la película de LDPE) y la velocidad del comienzo de la biodegradación. Por tanto es posible seleccionar una duración deseada para la película de LDPE (en términos amplios). Esta relación también permite que las poliolefinas que contienen el prodegradante se combinen (en proporciones bajas) en las corrientes de reciclado de PE habituales, puesto que el prodegradante se dispersará de manera uniforme por todo el PE reciclado, con un nivel que no afecta significativamente a su durabilidad.

Tales aditivos parecen no haberse utilizado previamente en moldeo de polietileno y polipropileno a granel, tal como se requeriría para la mayoría de los componentes de los dispositivos de ensayo de la presente invención. En la presente invención, puede seleccionarse un nivel de prodegradante e incorporarse en la poliolefina antes del moldeo, para dar una tasa de oxo-biodegradación razonable una vez que se ha utilizado el dispositivo y se ha eliminado en un vertedero, o cualquier otro medio de eliminación aerobia, a la vez que se permite reciclar como poliolefina "pura", si se prefiere. Si hay preocupación acerca de la oxidación que tiene lugar antes de su utilización, debe evitarse la oxidación prematura mediante el almacenamiento en bolsas opacas a la luz UV, selladas, preferiblemente o bien selladas a vacío o bien rellenas con una atmósfera inerte.

Los aditivos prodegradantes parecen presentar poco efecto sobre las propiedades físicas de un polímero en el que se incorporan, y algunos se han aprobado para el contacto con alimentos por la FDA, por lo que es poco probable que haya peligros significativos asociados con su utilización. Adicionalmente, el coste por tonelada del prodegradante es poco más que el de la poliolefina, mientras que los plásticos biodegradables especializados pueden ser diez o veinte veces más caros.

Medido en lo que se refiere a las sales de metal puras, el prodegradante puede ser suficientemente eficaz a niveles de tan solo el 0,05% en peso. Sin embargo, para un efecto significativo sobre la biodegradabilidad, es probable que puedan necesitarse niveles de hasta el 0,1%, el 0,5% o incluso el 1%, dependiendo de la velocidad de degradación requerida. Considerado como un nivel de lote maestro, la combinación del 1-3% en peso del concentrado parece ser un buen punto de partida. Niveles bajos retardarían la biodegradación, pero aumentarían la vida útil de almacenamiento. Niveles superiores producirían una degradación más rápida tras la eliminación, pero posiblemente podrían dañar otras propiedades, tales como el color y las propiedades físicas, si los niveles se elevaran demasiado.

El nivel preciso para cada utilización sería por tanto sencilla de optimizar. Ahora hay una regla de la American Society of Testing & Materials (ASTM) para someter a prueba materiales oxobiodegradable (ASTM D6954-04), y está redactándose actualmente una regla británica (BS8472). Por tanto, debe ser relativamente habitual evaluar el rendimiento de diferentes niveles de aditivo para un resultado deseado.

Pueden utilizarse otros aditivos utilizados de manera convencional en el polímero, tales como aditivos para mantener el polímero estable a altas temperaturas durante el procesamiento y fotoestabilizadores para evitar la degradación prematura bajo irradiación ultravioleta. Alternativamente, pueden reducirse los niveles normales de fotoestabilizador, de modo que la degradación iniciada por luz UV pueda reforzar el efecto de la oxo-biodegradación.

Por tanto, hacer que la cubierta 2 y otros componentes del dispositivo de ensayo 1 sean oxobiodegradables, por ejemplo añadiendo un prodegradante, debe evitar los problemas existentes con la eliminación en vertederos de decenas o centenas de millones de dispositivos de ensayo, a la vez que no se daña ninguna otra propiedad importante.

Un posible problema con los procesos de oxo-biodegradación descritos anteriormente es que pueden ralentizarse significativamente en condiciones de frío. Por tanto, para los productos destinados a su utilización en Canadá, Escandinavia y Rusia, por ejemplo, las condiciones ambientales durante la mayor parte del año darían como resultado la degradación desacelerada del polímero eliminado.

En tales casos, puede preferirse un enfoque alternativo. Se sabe cómo rellenar poliolefinas, particularmente LDPE, con micropartículas de almidón sólido, normalmente a niveles de hasta el 15% en peso. Los gránulos de almidón (u otros biopolímeros) son accesibles inmediatamente al ataque microbiológico, haciendo que la poliolefina se disgregue (relativamente) de manera rápida en fragmentos que presentan un impacto ecológico relativamente bajo. Los polímeros rellenos de almidón no pueden reciclarse en corrientes de reciclado habituales, y a altos niveles, puede resultar afectada la resistencia del polímero. Por tanto, en muchos casos, se preferirían probablemente sistemas oxobiodegradables. Sin embargo, cuando el proceso de oxo-biodegradación se ralentiza potencialmente, los polímeros rellenos de almidón deben comprender una alternativa adecuada.

65

Los gránulos de almidón y los aditivos de prodegradante deben ser compatibles entre sí y por tanto debe ser posible incorporar ambos en un único polímero si se desea.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo de prueba de inmunoensayo (1, 21), que comprende unos medios de prueba de inmunoensayo (7, 8, 17, 18) montados sobre unos medios de estructura (2, 5), comprendiendo dichos medios de estructura (2, 5) unos medios de cubierta (2) adaptados para encerrar los medios de prueba de inmunoensayo (7, 8, 17, 18), caracterizado por que los medios de cubierta (2) comprenden un material de plástico oxobiodegradable, adaptado de tal manera que su degradación se inicie mediante la reacción con oxígeno.
- 10 2. Dispositivo (1, 21) según la reivindicación 1, caracterizado por que sustancialmente todos los medios de estructura (2, 5) del dispositivo (1, 21) comprenden dicho material de plástico oxobiodegradable.
- 15 3. Dispositivo (1, 21) según cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el material de plástico oxobiodegradable comprende un material de plástico lleno de partículas de un material más fácilmente biodegradable.
- 20 4. Dispositivo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el material de plástico oxobiodegradable comprende un polímero de poliolefina.
- 25 5. Dispositivo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el material de plástico oxobiodegradable comprende un material de plástico mezclado con un aditivo adaptado para promover la degradación oxidativa del material de plástico.
- 30 6. Dispositivo (1, 21) según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho aditivo para promover la degradación oxidativa comprende por lo menos una sal de metal, opcionalmente por lo menos un carboxilato de metal.
- 35 7. Dispositivo (1, 21) según cualquiera de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, caracterizado por que dicho aditivo para promover la degradación oxidativa comprende un material a base de hidrocarburos de cadena larga, opcionalmente derivado de residuos de refino del petróleo.
- 40 8. Dispositivo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende un dispositivo de prueba de embarazo (1, 21).
- 45 9. Dispositivo de prueba de inmunoensayo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende unos medios de prueba de inmunoensayo y unos medios de cubierta (7, 8, 17, 18), caracterizado por que los medios de prueba (7, 8, 17, 18) pueden desplazarse selectivamente entre una primera disposición que se extiende hacia fuera desde los medios de cubierta (2) y una segunda disposición sustancialmente encerrada dentro de los medios de cubierta (2).
- 50 10. Dispositivo de prueba de inmunoensayo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende medios de prueba de inmunoensayo (7, 8, 17, 18), caracterizado por que dichos medios de prueba (7, 8, 17, 18) están adaptados para producir, como indicación de un resultado de prueba positivo, un cambio de color que se extiende a través de una zona bidimensional del material de prueba (7, 8, 25, 26).
11. Dispositivo de prueba de inmunoensayo (1, 21) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el dispositivo (1, 21) comprende dos medios de prueba de inmunoensayo (7, 8, 17, 18).
12. Dispositivo de prueba de inmunoensayo (1, 21) según la reivindicación 11, caracterizado por que un primero (7, 17) de dichos medios de prueba de inmunoensayo está adaptado para indicar un resultado de prueba positivo y un segundo (8, 18) de dichos medios de prueba de inmunoensayo está adaptado para indicar un resultado de prueba negativo.

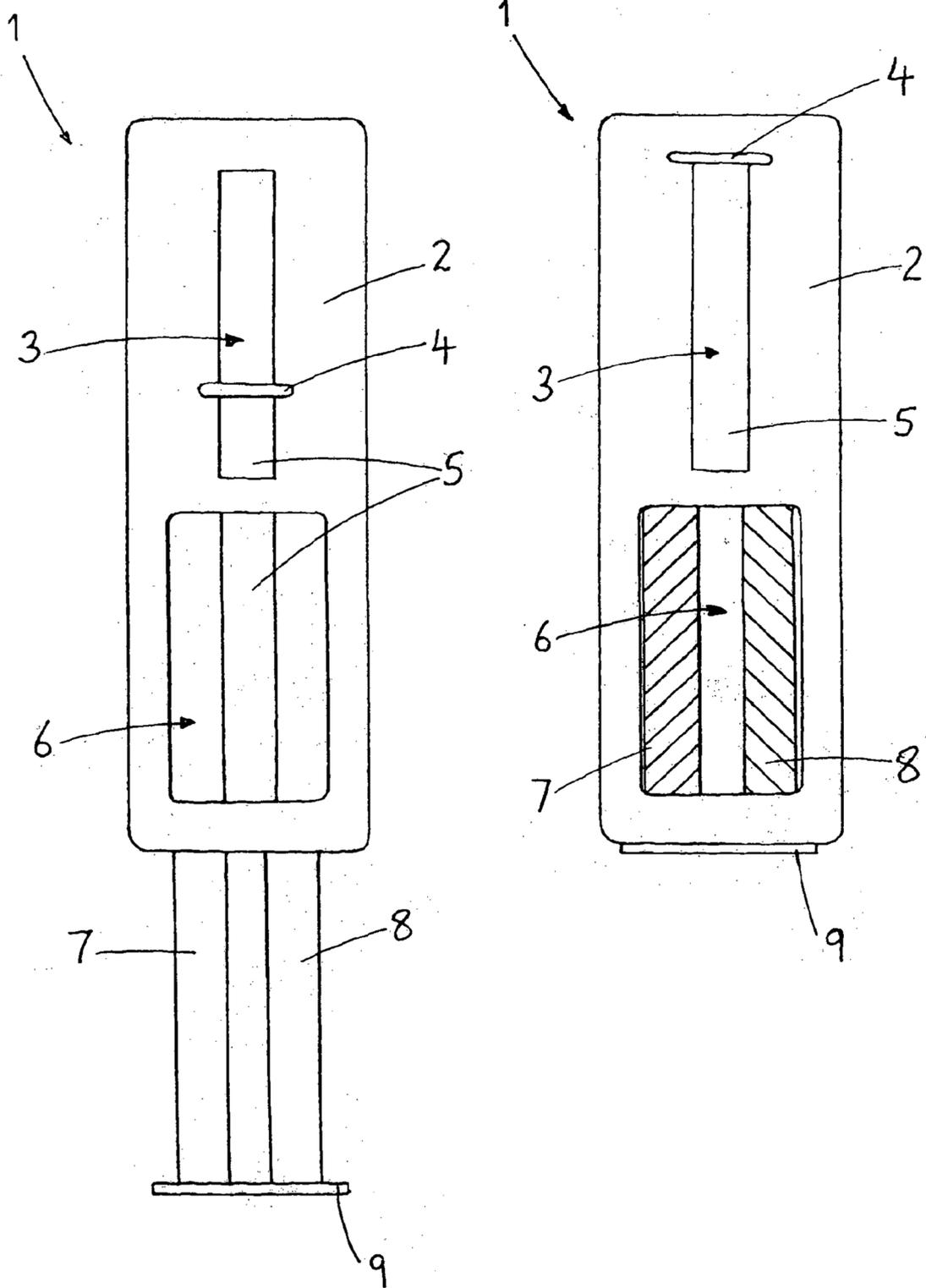


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

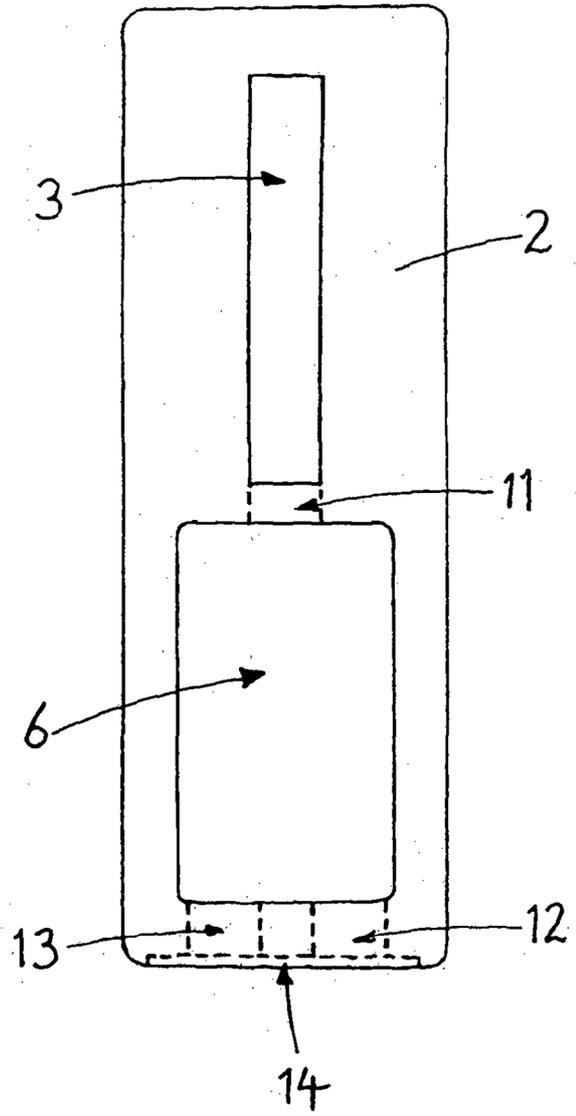
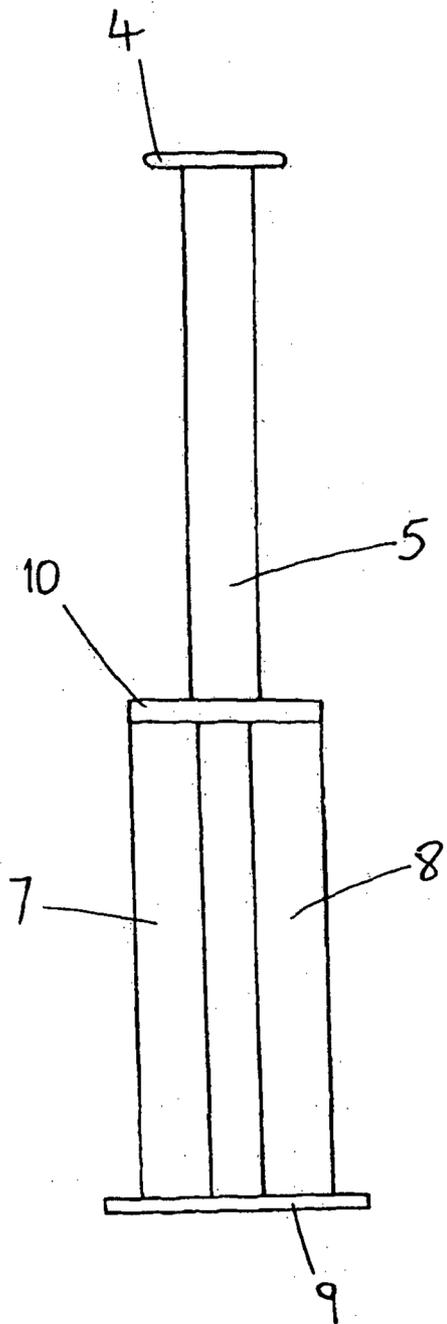


Fig. 4

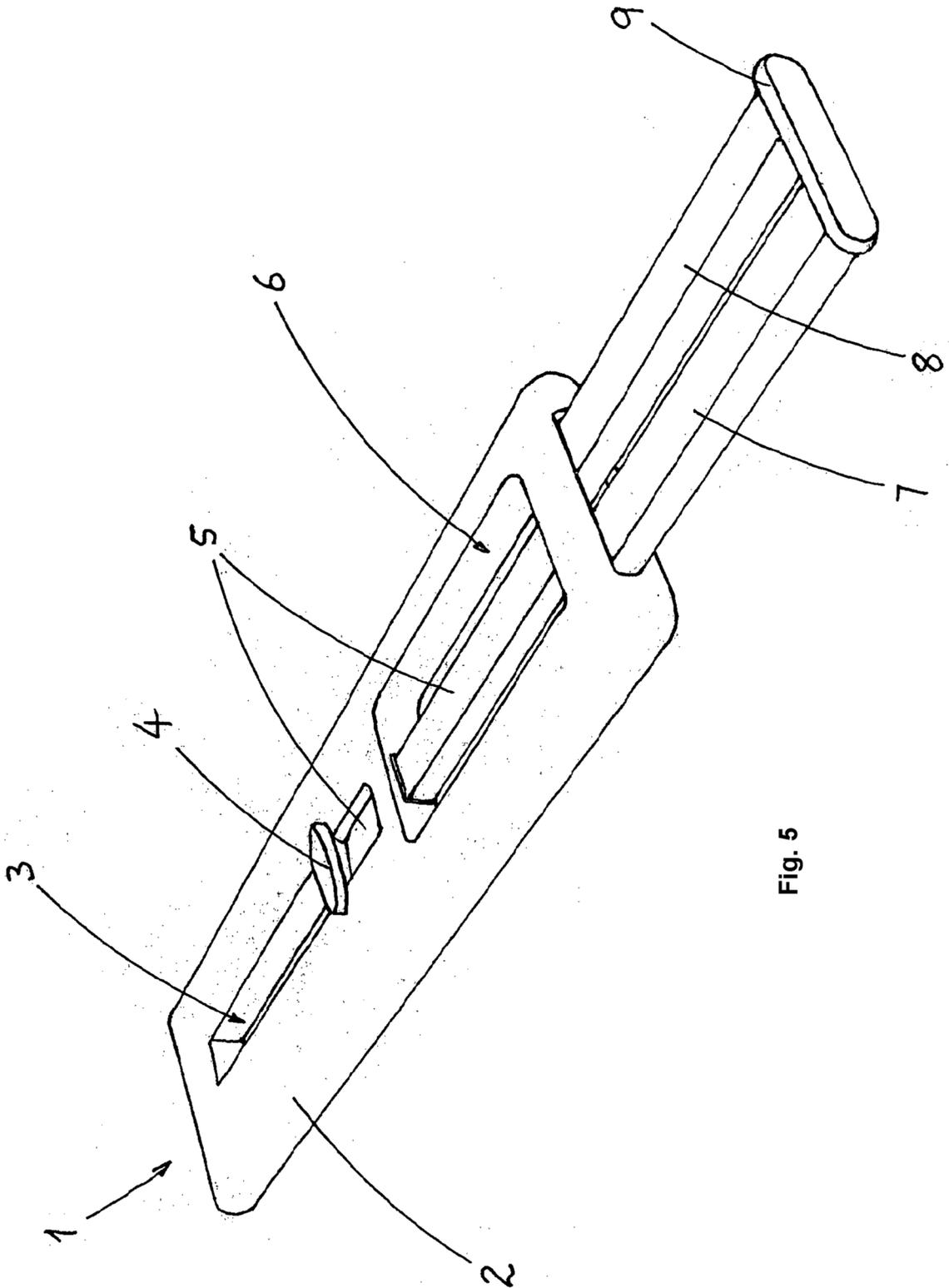


Fig. 5

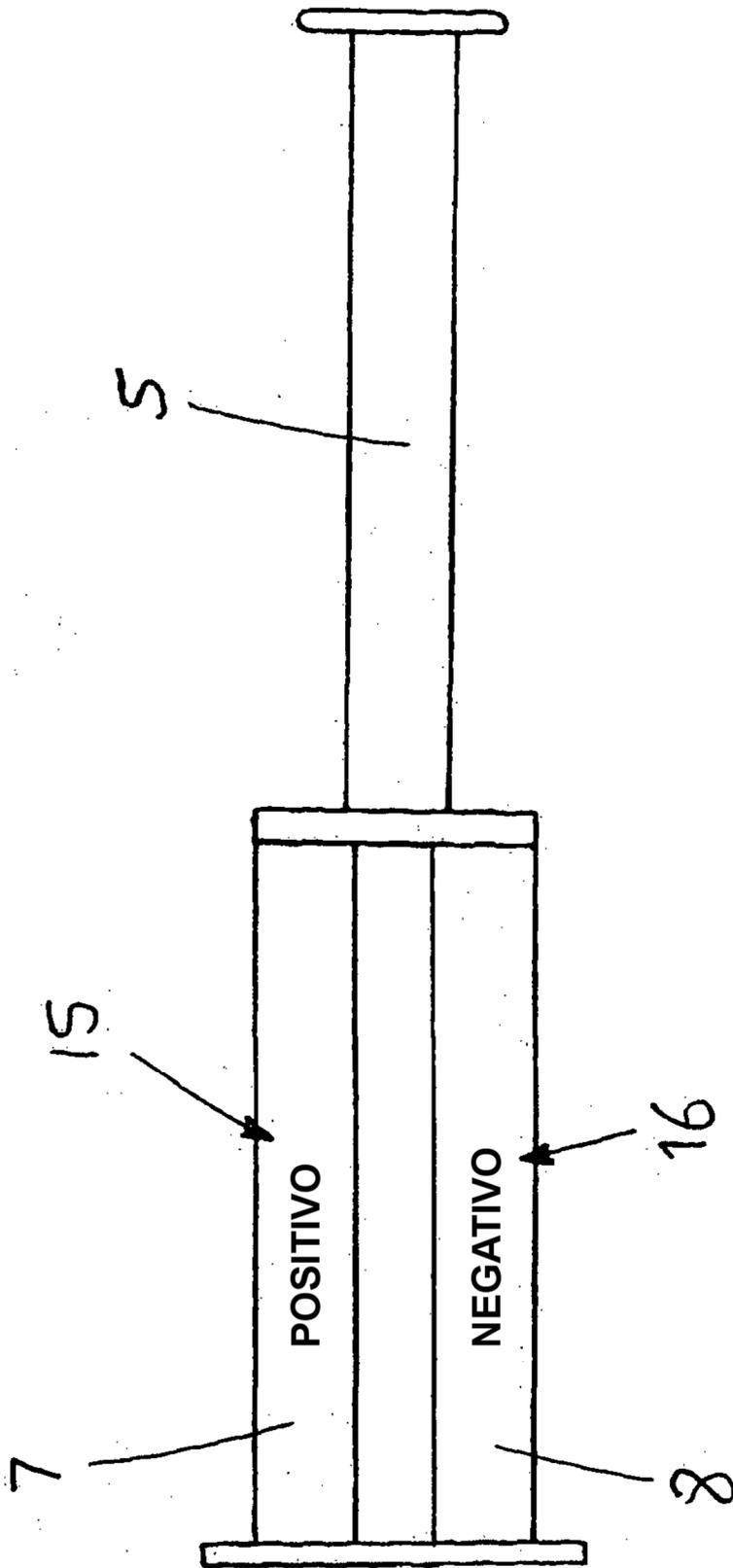


Fig. 6

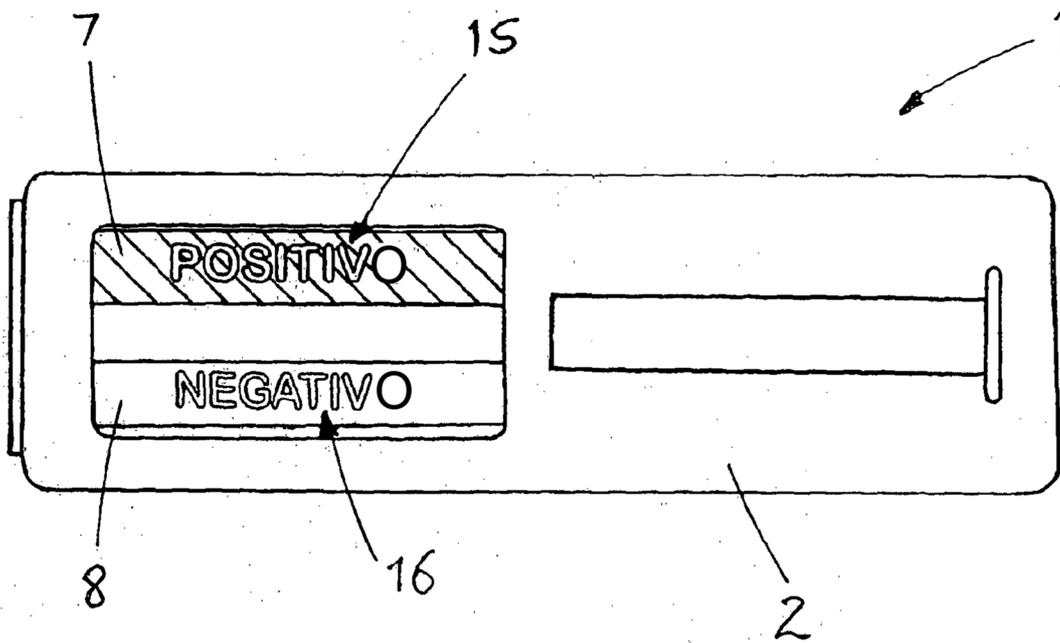


Fig. 7

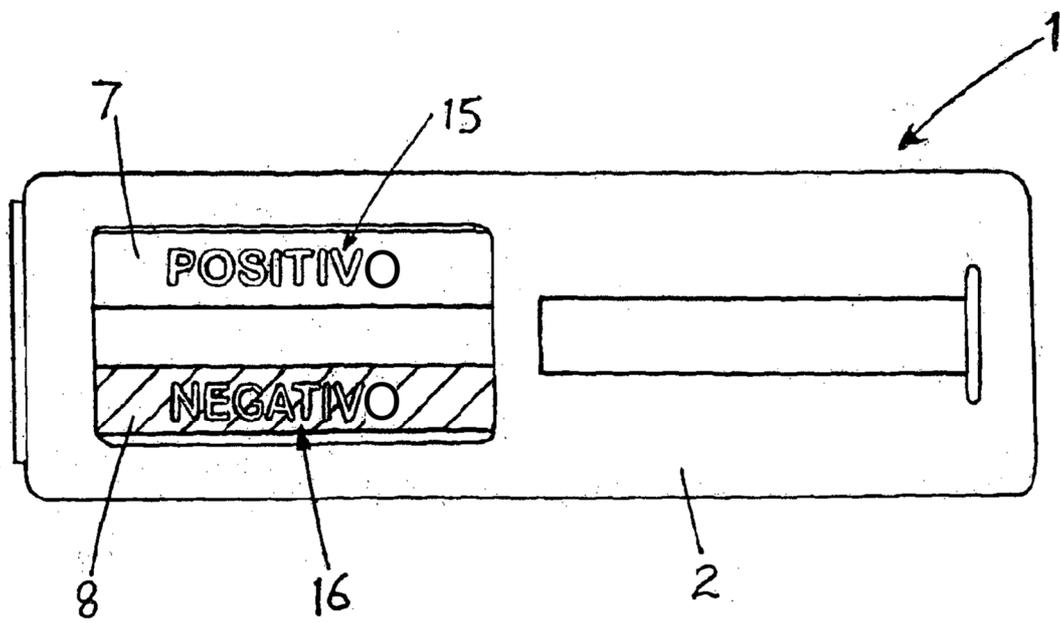


Fig. 8

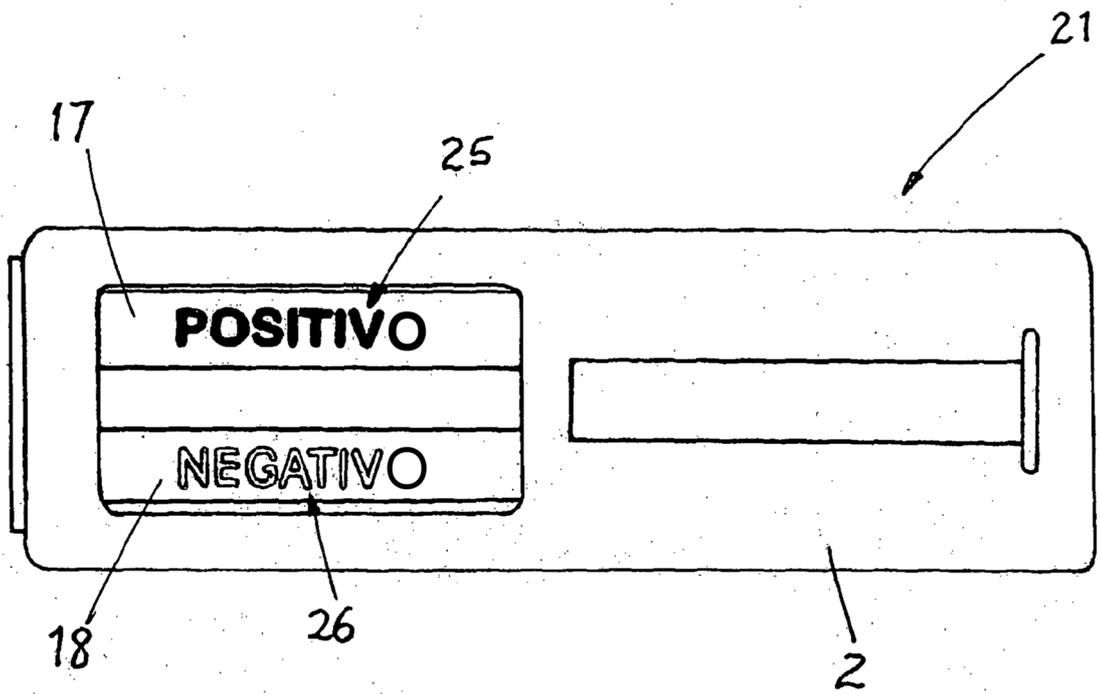


Fig. 9

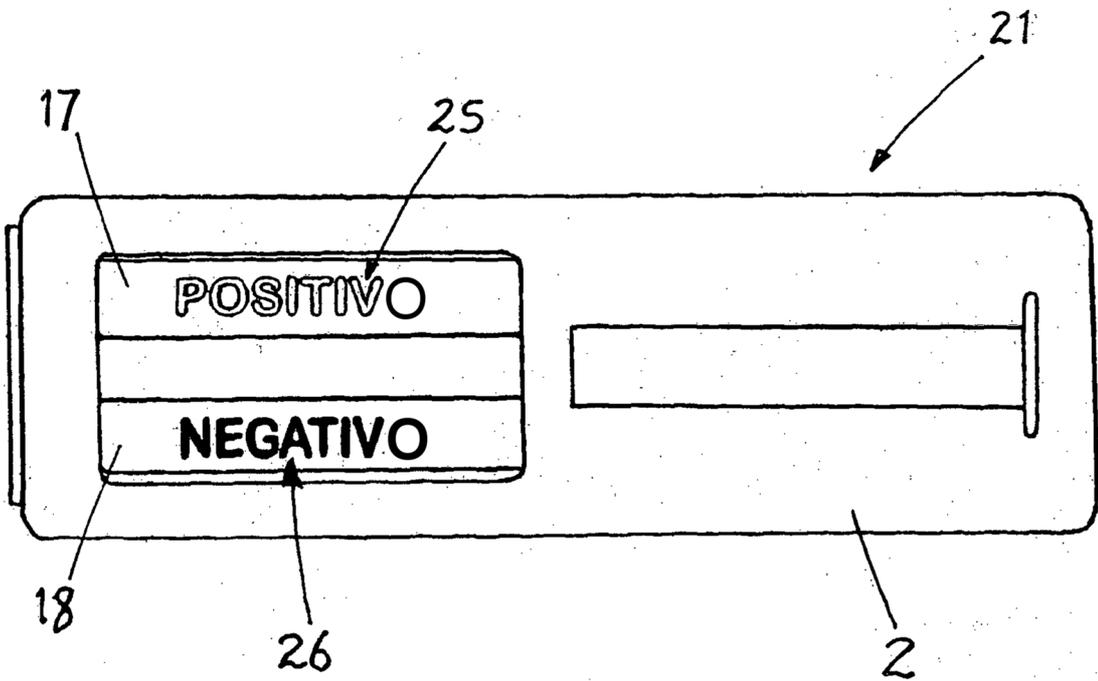


Fig. 10