



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102010901861849
Data Deposito	28/07/2010
Data Pubblicazione	28/01/2012

Classifiche IPC

Titolo

**PROCEDIMENTO ED APPARECCHIATURA PER LA CARATTERIZZAZIONE E LA
SEPARAZIONE DI SPERMATOZOI CON SENSORI MICROMETRICI A LEVA SOSPESA**

"Procedimento ed apparecchiatura per la caratterizzazione e la separazione di spermatozoi con sensori micrometrici a leva sospesa"

"A method and an apparatus for characterizing and separating spermatozoa with suspended lever micrometric sensors"

DESCRIZIONE

Settore della Tecnica

La presente invenzione ha per oggetto un metodo ed un'apparecchiatura per il sessaggio di spermatozoi animali.

10 Per sessaggio dello sperma si intende l'operazione di discriminazione tra spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi portatori del cromosoma Y, che ha come finalità la determinazione del sesso del nascituro utilizzando la tecnica della fecondazione artificiale (FA). In ambito
15 zootecnico la FA ha consentito di ottimizzare la selezione degli animali per caratteristiche utili e le tecniche di preselezione dei sessi rappresentano un ulteriore miglioramento per gli allevatori interessati sia alla produzione di latte sia alla produzione di carne. In questo
20 modo, infatti, diventa possibile la programmazione delle inseminazioni delle vacche da cui ottenere le vitelle da destinare alla rimonta aziendale o dei vitelli da introdurre in centri genetici, consentendo l'inseminazione delle altre vacche con tori da carne, che permettono di ottenere vitelli
25 da ristallo di maggior valore.

Arte Nota

Nel tempo si sono susseguiti vari approcci tecnologici al sessaggio, ma lo sviluppo di tipo industriale delle metodiche di preselezione degli spermatozoi è stato reso possibile
30 dalla citofluorimetria a flusso, che rappresenta oggi l'unica tecnica commercialmente utilizzabile. L'elevata sensibilità del citofluorimetro consente di misurare l'unica differenza accertata sperimentalmente fra gli spermatozoi portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y: la diversa

quantità di DNA, associata alla diversa grandezza dei cromosomi sessuali (differenza di circa il 3 - 5%, variabile secondo la specie a favore del cromosoma X).

Il citofluorimetro a flusso è un sistema che consiste di una o più sorgenti laser, di un sistema idrodinamico che immette le cellule del campione da analizzare in un flusso di liquido isototonico che incrocia il raggio laser, di rilevatori di luce (fotodiodi e/o fotomoltiplicatori) e di un elaboratore per l'analisi dei dati in tempo reale.

L'analisi si basa sulla valutazione della quantità di luce emessa dalle cellule che incrociano il raggio laser. Le cellule sono preventivamente colorate con fluorocromi, che emettono fluorescenza quando investiti dalla luce di una data lunghezza d'onda (in questo caso rappresentata dal raggio laser). La fluorescenza, dopo essere stata amplificata dai fotomoltiplicatori e convertita in segnale digitale, è analizzata da un software.

Dopo l'incrocio con il raggio laser, dal fluido di trascinamento sono generate gocce che inglobano singoli spermatozoi ed ogni goccia è caricata elettricamente in modo positivo o negativo in funzione della misura della fluorescenza dello spermatozoo ivi contenuto. Quindi le gocce cariche passano attraverso due piastre ad alta tensione, dove saranno deviate in due raccoglitori (insieme allo spermatozoo in esse contenuto) in base al segno della carica.

Colorando gli spermatozoi con un fluorocromo che si lega stechiometricamente con il DNA (quale p. es. Bisbenzimidide Hoechst 33342 che si lega alle regioni ricche di adenina e timina del DNA) e definendo la selezione ("sorting") in funzione della bimodalità della distribuzione di frequenza del contenuto di DNA degli spermatozoi (Johnson et al., 1989, Biol. Reprod. 41:199-203), è possibile dividerli in due popolazioni, quelli portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y (Garner et al, 1983, Biol. Reprod.

28:312-321; Johnson, 1991, *Reprod. Dom. Anim.* 26:309-314; Johnson et al., 1989, *Biol. Reprod.* 41:199-203; Morell et al., 1988, *Vet. Rec.* 122:322-324).

Nel brevetto francese FR 2699678 è descritto un metodo di
5 sessaggio in cui la selezione ("sorting") delle cellule avviene senza caricamento elettrico delle stesse in funzione delle particolari caratteristiche del citofluorimetro utilizzato (PAS III, Partec).

Nel brevetto inglese GB 2145102 è descritto un metodo di
10 sessaggio mediante citofluorimetria a flusso che sfrutta il caricamento elettrico degli spermatozoi effettuato in un liquido di trascinamento adatto.

Un metodo di sessaggio del seme mediante citofluorimetria a flusso, basato sullo stesso principio di separazione in base
15 alla carica, è descritto nella domanda di brevetto internazionale WO 90/13303, che utilizza un citofluorimetro a flusso Epics V (RTM, Coulter). La metodica di sessaggio proposta si basa su una serie di modifiche migliorative dello strumento (modificazione dell'ago della cella a flusso) tali
20 da creare un flusso con una maggior percentuale di cellule orientate con la superficie maggiore perpendicolare al raggio laser. Inoltre viene sostituito il fotodiode normalmente deputato alla valutazione della luce diffratta a 0°- 18° (valutazione dimensionale delle particelle) con un
25 fotomoltiplicatore in grado di rilevare anche bassi livelli di fluorescenza (Johnson e Pinkel, 1986 (*Cytometry*, 7:268-273). E' stata quindi approntata una seconda serie di modifiche strumentali comprendenti una nuova cella a flusso (Johnson e Welch, 1999, *Theriog.* 52:1323-1341) con un
30 conseguente aumento della percentuale di cellule correttamente orientate dal 25% al 70%. L'applicazione di tale cella ad un citofluorimetro ad alta velocità di selezione, ottenuta applicando pressioni fino a 60 PSI alle cellule nel flusso (MoFlo® Cytomation Inc. - high speed cell

sorter), ha permesso di ottenere uno strumento in grado di selezionare e separare teoricamente fino a 9 milioni di spermatozoi per ora con una purezza del 75-80% (Brevetti USA n. 5150313, 5602039, 5602349, 5643796 e domanda internazionale WO 25 96/12171). Il materiale seminale raccolto deve poi essere lavato tramite centrifugazione, opportunamente diluito, confezionato in "paillettes" da 0,25 ml e congelato secondo protocolli molto dettagliati, come descritto nella domanda internazionale PCT/US2003/5 030814. Utilizzando in FA dosi di seme congelato bovino sessato (Seidel et al., 1999, Theriog. 52:1407- 1420) sono stati ottenuti valori di fertilità accettabili, pur dovendo operare con opportune accortezze in termini di strumentazione, sito di deposito del seme nell'apparato genitale femminile e tipologia di animali (manze) (domanda internazionale WO 99/33956).

La metodologia citofluorimetrica tuttavia non è scevra da inconvenienti, dei quali il principale riguarda il numero di spermatozoi separabili per unità di tempo che, pur avendo avuto notevoli incrementi, rimane ancora sostanzialmente basso. Infatti, se si vuole ottenere un livello di purezza dell'arricchimento pari al 90% con spermatozoi di buona vitalità, adatti per il congelamento, non è possibile ottenere più 5000 spermatozoi per secondo. Questo valore comporta una limitata produzione di dosi di seme sessato congelato, anche utilizzando una ridotta concentrazione totale per dose.

Inoltre, l'uso di sostanze fluorescenti non esclude a priori possibili azioni mutagene rispetto al contenuto di DNA degli spermatozoi.

Infine, la rilevazione della fluorescenza, e quindi la qualità dei risultati, può essere influenzata dall'orientamento degli spermatozoi lungo la linea di distribuzione.

Metodi per il sessaggio dello sperma, alternativi alla citofluorimetria, devono basarsi sulla differenza di contenuto di DNA tra gli spermatozoi portatori del cromosoma X e gli spermatozoi portatori del cromosoma Y. Tale differenza di contenuto suggerisce, in particolare, una differenza nelle dimensioni e nella massa delle due tipologie di spermatozoi che è stimabile intorno al 3-5%.

Allo stato attuale sono stati effettuati studi sperimentali atti a verificare l'effettiva esistenza di differenze morfologiche tra le teste, in cui è contenuto il DNA, di spermatozoi portatori del cromosoma X e le teste di spermatozoi portatori del cromosoma Y. Le ricerche sono state incentrate soprattutto sullo studio delle dimensioni attraverso tecniche di analisi delle immagini (van Munster et al., 1999, Cytometry 35:125-128). Ad oggi, però, non sono stati riscontrati risultati sperimentali sulla differenza di massa tra le due tipologie di spermatozoo, con l'uso di metodologie dirette.

Nonostante ciò, gli inventori proponenti hanno effettuato la prima misura sperimentale sulla massa di un singolo spermatozoo, attraverso l'uso di microbilance a cristalli di quarzo (QCM - Quartz Crystal Microbilances). Il valor medio di massa di un singolo spermatozoo bovino, dopo una serie di pesate di popolazioni di spermatozoi, è risultato pari a $1.95 \pm 0.04 \times 10^{-11}$ g. Considerando il valore di massa misurato, la differenza di massa tra spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi del cromosoma Y è valutabile intorno ad un valore compreso tra 0.5 pg e 1 pg (1 pg = 10^{-12} g).

Inoltre, nel documento IT T020080101 (A1) è stato già descritto un procedimento e apparecchiatura per il sessaggio di spermatozoi animali, basato sull'utilizzo di microcantilever come sensori di massa. Il presente brevetto mostra diversi miglioramenti rispetto al precedente,

principalmente per quanto riguarda la metodologia di impiego del sensore microcantilever: tale metodologia assicura una maggiore sensibilità in massa, come è stato dimostrato da misure sperimentali effettuate utilizzando un microcantilever commerciale.

Descrizione dell'Invenzione

Alla luce di quanto discusso e dei risultati scientifici, l'invenzione fornisce, in un primo aspetto, un procedimento per il sessaggio di spermatozoi, in cui si determina la differenza di contenuto cromosomico tra gli spermatozoi di una popolazione mista con un metodo alternativo a quello citofluorimetrico, in quanto si basa sulla differenza in massa tra gli spermatozoi dovuto a tale differenza di contenuto cromosomico. In un secondo aspetto, la differenziazione degli spermatozoi, secondo il metodo citato, è effettuata utilizzando un'apparecchiatura basata su strutture micrometriche a leva sospesa, i cosiddetti cantilever o microcantilever.

I cantilever (o microcantilever) sono sensori micromeccanici costituiti sostanzialmente da una leva sospesa di dimensioni micrometriche, composta da silicio monocristallino, da SiN, da materiali polimerici o altri materiali. Mediante opportuni sistemi di rivelazione, i cantilever trasducono una forza agente sulla loro estremità, dovuta p. es. alla presenza di una massa aggiuntiva, in una flessione (funzionamento statico). Se invece sono opportunamente stimolati per vibrare, la presenza della massa aggiuntiva sul cantilever induce una variazione sia della differenza di fase tra segnale di attuazione e segnale di risposta, sia della frequenza propria di risonanza (funzionamento dinamico). Come è noto dalla letteratura scientifica, i cantilever sono stati proposti come sensori di massa con sensibilità che permettono di apprezzare variazioni anche inferiori all'attogrammo ($1 \text{ ag} = 10^{-18}$), si veda per esempio Li et al., 2007, Nature

Nanotechnology 2:114-120 e Burg et al. 2007, Nature 446:1066-1069. La sensibilità varia, generalmente, in funzione delle proprietà meccaniche e/o geometriche, quali ad esempio, la dimensione, la forma e i materiali costituenti il cantilever.

5 Per l'uso dei cantilever per misure di massa in microbiologia si veda p. es. il brevetto WO 2008/045988 A1, incentrato sulla calibrazione della relazione tra massa e frequenza di risonanza di un così detto "Suspended Microchannel Resonator", e i documenti US 2007/089515 A1, EP 1533611 A1 e
10 WO 2007/081902 A2.

Una rassegna sulle tecniche di costruzione, sui principi di funzionamento e sulle modalità di utilizzazione dei microcantilever soprattutto in ambito biologico, può essere trovata in Goeders et al., 2008, Chem. Rev. 108:522-542 e
15 Lavrik et al., 2004, Rev. of Sci. Instr., 75:2229-2253.

I valori di sensibilità di un cantilever sono ben inferiori alle variazioni dovute alla stimata differenza di massa tra spermatozoi portatori del cromosoma X e portatori del cromosoma Y, pertanto essi possono essere posti alla base di
20 una apparecchiatura di sessaggio. In particolare, secondo un primo aspetto dell'invenzione si fa circolare un fluido contenente una popolazione mista di spermatozoi in un canale di microcircolazione fluidica integrato con il microcantilever, e avente dimensioni tali da lasciar passare
25 un solo spermatozoo per volta, e si separano gli spermatozoi portatori del cromosoma X e portatori del cromosoma Y dopo la loro uscita da tale canale, in seguito alla differente risposta del segnale proveniente dal sensore. Tale differenziazione può avvenire in funzionamento statico,
30 rilevando variazioni di flessione del microcantilever, oppure può avvenire in funzionamento dinamico, rilevando le variazioni della differenza di fase tra segnale di attuazione e di risposta, oppure le variazioni della frequenza di risonanza del microcantilever.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione, si fornisce un'apparecchiatura per realizzare il procedimento di sessaggio, comprendente: una sorgente di una popolazione mista di spermatozoi; almeno un elemento sensibile atto a ricevere tali spermatozoi e a fornire una risposta diversa in presenza di uno spermatozoo portatore del cromosoma Y o di uno spermatozoo portatore del cromosoma X; mezzi di rilevamento e analisi di detta risposta e mezzi di separazione degli spermatozoi con diverso contenuto cromosomico. Nell'apparecchiatura, l'almeno un elemento sensibile è un elemento sensibile ad uno spermatozoo singolo, preferibilmente un elemento che impiega almeno una struttura micrometrica a leva sospesa con canale di circolazione microfluidica integrato.

Inoltre secondo un altro aspetto dell'invenzione, allo scopo di ottenere una resa elevata, si può utilizzare una pluralità di dette strutture, ognuna composta da un cantilever singolo o da una schiera integrata di cantilever disposte in parallelo, che ricevono simultaneamente il fluido contenente gli spermatozoi da sessare.

La struttura o la pluralità di strutture può essere fatta funzionare in modalità attiva o passiva, e il procedimento di differenziazione degli spermatozoi risulta identico a quello impiegato per singolo microcantilever.

25 *Descrizione Sintetica delle Figure*

L'invenzione sarà ora descritta con maggiori dettagli con riferimento ai disegni allegati, forniti a titolo di esempio non limitativo, in cui:

- la Fig. 1 è uno schema a blocchi dell'apparecchiatura di sessaggio secondo l'invenzione;
- la Fig. 2 mostra un cantilever come utilizzato nella presente invenzione;
- la Fig.3 mostra una schiera di cantilever come utilizzata nella presente invenzione;

- le Figg. 4A e 4B mostrano le modalità di discriminazione tra spermatozoi portatori del cromosoma X o del cromosoma Y, in modalità statica;

5 - la Fig. 5 mostra la modalità di discriminazione tra spermatozoi portatori del cromosoma X o del cromosoma Y, in modalità dinamica e in funzione della variazione della differenza di fase tra segnale di input e output; e

- la Fig. 6 mostra lo schema di principio della tecnica di misura della variazione della differenza di fase tra segnale di attuazione e segnale di risposta, oppure della variazione di frequenza, come realizzata nella presente invenzione.

10 La Fig. 1 mostra uno schema a blocchi di un'apparecchiatura per l'identificazione e il sessaggio di spermatozoi.

L'apparecchiatura, indicata nel suo complesso con 1, consiste
15 principalmente di:

- una sorgente 2 di una popolazione mista di spermatozoi;

- un modulo di sessaggio 3 composto a sua volta da:

- uno o più elementi (due in figura) 30a, 30b sensibili alla massa di spermatozoi singoli;

20 - un sistema di lettura 31 per la rilevazione della risposta degli elementi sensibili 30a, 30b al passaggio degli spermatozoi; e

- uno o più elementi 32a, 32b per la separazione, in base alla presenza del cromosoma X o Y, degli spermatozoi che sono
25 passati attraverso gli elementi sensibili 30;

- un sistema 4 per lo stoccaggio degli spermatozoi sessati;

- un'unità di controllo 5.

Nella figura, linee a doppio tratto indicano il percorso degli spermatozoi, mentre linee a singolo tratto indicano il
30 percorso dei segnali di lettura e di comando. La sorgente 2 della popolazione mista di spermatozoi è costituita, come usuale nelle tecniche di sessaggio, da un fluido isotonico contenente gli spermatozoi, ed è collegata al modulo di sessaggio 3 mediante un sistema di distribuzione,

schematizzato dalla linea di distribuzione 6, sulla quale è inserita una pompa 7 controllata dall'unità di controllo 5 in modo da regolare opportunamente la portata di fluido.

Nella realizzazione preferita della presente invenzione, gli
5 elementi sensibili 30 si basano sui cosiddetti cantilever o microcantilever, con sistema di microfluidica integrato all'interno del quale circolano gli spermatozoi proveniente dalla sorgente 2. L'elemento o ciascun elemento sensibile può essere costituito da un cantilever singolo, come quello
10 rappresentato in Fig. 2, o da una schiera integrata di cantilever, come quella rappresentata in Fig. 3. I cantilever o le schiere di cantilever possono essere fatti operare in modalità attiva o passiva. Maggiori dettagli sul modo d'impiego dei cantilever nella presente invenzione
15 saranno dati in seguito.

Il sistema di lettura 31 rileva le sollecitazioni meccaniche indotte dall'alterazione delle proprietà locali di equilibrio del cantilever al passaggio di uno spermatozoo all'interno del fluido circolante nel canale microfluidico integrato. In
20 particolare, il sistema di lettura 31 rileva in modalità di funzionamento passiva la flessione dei cantilever, invece in modalità di funzionamento attiva rileva la variazione della differenza di fase tra segnale di input e segnali di output oppure la variazione della frequenza di risonanza.

25 Per quanto riguarda la modalità di funzionamento attiva, in Fig. 6 si mostra lo schema di principio della tecnica di misura della variazione della differenza di fase, oppure della frequenza di risonanza, impiegata nella realizzazione preferita dell'invenzione. In tale realizzazione il
30 microcantilever è attuato, utilizzando ad esempio un elemento piezoelettrico, ad una frequenza prossima a quella di risonanza. L'oscillazione del microcantilever viene rilevata attraverso un sistema di trasduzione, per esempio attraverso lettura ottica. I segnali di input (attuazione) e di output

(vibrazione del cantilever) vengono inviati ad un comparatore di fase e successivamente ad un controller che passa una informazione in retroazione al dispositivo che comanda l'attuatore, ad esempio un generatore di funzioni. Il
5 passaggio di un singolo spermatozoo nella fluidica del microcanale, determina la variazione temporanea delle condizioni di equilibrio del microcantilever, osservabile come una variazione transitoria della frequenza di oscillazione oppure della differenza di fase tra segnale di
10 input e di output, la cui massima intensità è determinata dalle caratteristiche fisiche e geometriche della particella circolante nel canale.

Descrizione Dettagliata dell'Invenzione

Nella presente invenzione si stabilisce che la tecnica di
15 calibrazione del sistema di sessaggio, consiste nel misurare il valor medio della massima variazione della differenza di fase oppure della frequenza di risonanza, al passaggio di una popolazione campione di spermatozoi Y. Il passaggio di uno spermatozoo X, caratterizzato da un contenuto cromosomico
20 maggiore, determinerà un segnale che supera la soglia stabilita in fase di calibrazione.

Gli elementi di separazione 32a, 32b sono associati ognuno a un cantilever 30a, 30b. Essi ricevono dal cantilever associato, tramite una linea 8a, 8b, il fluido contenente la
25 successione di spermatozoi sottoposti a misura e, a seconda che la misura abbia stabilito che uno spermatozoo presente su una linea 8 sia portatore del cromosoma X o Y, avvia tale spermatozoo al sistema di stoccaggio 4.

Gli elementi di separazione 32 sono per esempio elementi a
30 valvola con un ingresso collegato alla linea 8 e due uscite collegate, tramite rispettive linee 9a, 9b e 10a, 10b, a due unità di stoccaggio 40, 41, rispettivamente per i cromosomi X e Y. Le unità 40, 41 formano nel loro insieme il sistema di stoccaggio 4. Per esempio, gli elementi di separazione 32

sono configurati in modo da collegare normalmente l'ingresso 8 all'uscita 10 che porta all'unità 41 di stoccaggio degli spermatozoi portatori del cromosoma Y, e da collegare l'ingresso 8 all'uscita 9 che porta all'unità 40 di stoccaggio degli spermatozoi portatori del cromosoma X
5 ricevendo un esplicito comando dell'unità di controllo 5.

L'unità di controllo 5 effettua le elaborazioni dei segnali forniti dal sistema di lettura 31, necessarie per determinare il passaggio di uno spermatozoo portatore del cromosoma X o
10 Y. Inoltre essa gestirà e sincronizzerà i tempi di azionamento degli elementi di separazione 32 in base alla portata del sistema, ai tempi di elaborazione delle risposte dei sensori 30 e alla velocità di transito degli spermatozoi attraverso le linee 8.

15 La Fig. 2 illustra un sensore a cantilever singolo a lettura ottica. Il sensore 30 può essere schematizzato da un supporto o parte fissa 300 a cui è fissata un'estremità della leva sospesa 301, la cui estremità libera 302 è resa riflettente nei confronti una radiazione laser 310 proveniente dal
20 sistema di lettura 31.

Lungo la periferia di una leva 301 è realizzato un canale di circolazione microfluidica 303, lungo cui transitano gli spermatozoi. Il canale 303 è isolato dall'ambiente esterno ed è dimensionato in modo da garantire il passaggio di un
25 singolo spermatozoo per volta. Il canale 303 comprende un ramo d'ingresso 303A, collegato alla linea di distribuzione 6, ed un ramo d'uscita 303B, collegato alla linea 8 (Fig. 1).

30 La Fig. 3 mostra una schiera 330 di sensori integrati su un supporto comune, ancora indicato con 300. Ciascun sensore della schiera è identico al sensore singolo di Fig. 2, ed elementi uguali nelle due figure sono indicati con gli stessi numeri di riferimento, con l'aggiunta di apici singoli o

multipli per contraddistinguere elementi appartenenti a sensori diversi nella schiera.

Per fissare le idee, si descrive il meccanismo per il sessaggio di una popolazione mista di spermatozoi nel caso di
5 funzionamento dinamico, in cui si deve misurare la variazione della differenza di fase tra segnale di input e output, come descritto nella Fig. 5 L'unità di controllo 5 (Fig. 1) è tarata ad un determinato livello di soglia di risposta dei sensori, calibrato sul valor medio di picco del segnale
10 indotto dal rilevamento di uno spermatozoo portatore del cromosoma Y. Tutti gli spermatozoi portatori del cromosoma Y, che circolano attraverso i singoli cantilever 30, saranno riversati nella rispettiva linea 9 di distribuzione degli spermatozoi Y (che è tenuta normalmente aperta, cioè
15 collegata direttamente alla linea di uscita 8 del cantilever attraverso il rispettivo elemento di separazione 32) e attraverso tale linea giungeranno all'unità di stoccaggio 41. Il transito di uno spermatozoo portatore del cromosoma X, grazie alle sue diverse proprietà fisiche e geometriche,
20 indurrà un aumento nella risposta del cantilever e un conseguente superamento del livello di soglia del segnale. In questa circostanza, l'unità di controllo 5 azionerà l'elemento di separazione 32 in modo da dirottare il flusso verso la linea 9 di prelievamento degli spermatozoi X, per
25 l'invio all'unità di stoccaggio 40.

E' evidente che quanto descritto è dato unicamente a titolo di esempio non limitativo e che varianti e modifiche sono possibili senza uscire dal campo di protezione dell'invenzione. Inoltre, anche se si è descritta in dettaglio
30 una apparecchiatura per la discriminazione di spermatozoi portatori del cromosoma X da quelli Y, basata sulla misura della variazione della differenza di fase tra segnale di input e output, è evidente che il sistema di lettura 31 e l'unità di controllo 5 potranno operare su grandezze fisiche

diverse secondo il tipo di sensore utilizzato e le modalità d'impiego. Ancora, si potranno impiegare metodi di lettura diversi dalla lettura ottica.

Queste alternative sono ben note ai tecnici. P. es., i tre
5 documenti US 2007/089515, EP 1533611 e WO 2007/081902 citati sopra descrivono sistemi in cui si misurano le variazioni della frequenza di risonanza di cantilever funzionanti in modalità attiva, e US 2007/089515 ed EP 1533611 descrivono sistemi in cui si rileva una risposta di tipo elettrico.

10 Per quanto riguarda i metodi di lettura alternativi a quello della leva ottica, si specifica che cambia solo il dispositivo di trasduzione ma non la tecnica di rilevazione del segnale, come descritta nella Fig. 6. I possibili metodi alternativi vengono di seguito descritti:

15 - metodo piezoresistivo: si impiega un microcantilever con materiale piezoresistivo diffuso sulla superficie, il valore della resistenza elettrica dell'elemento piezoresistivo viene misurato utilizzando un ponte di Wheatstone. Quando il microcantilever oscilla o si flette, la variazione della
20 resistenza dell'elemento piezoresistivo determina il fluire di una corrente nei due rami del ponte di Wheatstone, permettendo di quantificare la flessione oppure la frequenza di oscillazione del microcantilever ;

- metodo piezoelettrico: si attuano i microcantilever
25 applicando una tensione alternata allo strato di materiale piezoelettrico che li ricopre. Le deformazioni del cantilever vengono rilevate perché inducono nel materiale piezoelettrico una variazione di corrente, a causa dell'effetto piezoelettrico diretto.

30 - metodo capacitivo: si utilizza un condensatore formato da due elettrodi, uno dei quali montato su supporto fisso e l'altro montato sulla superficie mobile del microcantilever. Quando il cantilever si flette, la capacitanza tra i due

elettrodi cambia permettendo di quantificare la deflessione del sensore.

I metodi appena descritti risultano vantaggiosi nella metodologia di sessaggio, sia perché il sensore
5 microcantilever e l'elettronica di lettura possono essere integrati in un unico chip e sia perché è possibile disporre facilmente i sensori in array.

L'invenzione risolve effettivamente i problemi della tecnica nota indicati sopra. La metodologia proposta permette
10 infatti di effettuare analisi sugli spermatozoi senza una preliminare preparazione dei campioni, come avviene nel caso della citofluorimetria. Gli spermatozoi non sono sottoposti ad alcun trattamento chimico, le cui conseguenze mutagene non sono ancora ben determinate. La tecnologia proposta non è
15 affetta dai problemi di orientamento degli spermatozoi lungo la linea di distribuzione.

Inoltre, a differenza dalla tecnica citofluorimetrica, il ritmo di sessaggio degli spermatozoi, cioè il numero di spermatozoi separabili per unità di tempo, non sarà
20 determinato soltanto dalla velocità del fluido all'interno del sistema di sessaggio (per il quale esiste un limite). Grazie alle dimensioni tipiche dei cantilever, l'invenzione permette, in linea di principio, un incremento illimitato della velocità di selezione, ottenuto semplicemente con
25 l'impiego di un maggior numero di cantilever o di schiere di cantilever e un conseguente aumento delle linee di distribuzione.

"Procedimento ed apparecchiatura per la caratterizzazione e la separazione di spermatozoi con sensori micrometrici a leva sospesa"

"A method and an apparatus for characterizing and separating spermatozoa with suspended lever micrometric sensors"

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la caratterizzazione e separazione di spermatozoi tra portatori del cromosoma Y e portatori del cromosoma X mediante la risposta di un sensore micrometrico a
10 leva sospesa (30; 30a, 30b).

2. Procedimento secondo la riv. 1, in cui si fa circolare un fluido contenente spermatozoi in un canale di microcircolazione fluidica (303; 303', 303'', 303''') integrato con la leva (301) di almeno una struttura
15 micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) in grado di lasciar transitare un solo spermatozoo per volta, e si separano gli spermatozoi uscenti da tale canale (303; 303', 303'', 303''').

3. Procedimento secondo la riv. 2, in cui si misurano le
20 flessioni della leva (301) di almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) indotte dal passaggio di uno spermatozoo.

4. Procedimento secondo la riv. 3, in cui:
• mediante procedura di calibrazione, si stabilisce
25 un valore di soglia in base alle caratteristiche del segnale prodotto da un campione di almeno una delle 2 tipologie di spermatozoi;

• la caratterizzazione e separazione avviene attraverso l'analisi della risposta rispetto al valore di
30 soglia predeterminato.

5. Procedimento secondo la riv. 2, in cui si pone in vibrazione la leva (301) di almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) con una frequenza di vibrazione opportuna e si misurano le variazioni della differenza di

fase tra tale segnale di attuazione e il segnale rilevato, al passaggio di uno spermatozoo.

6. Procedimento secondo la riv. 2, caratterizzato dal fatto che si pone in vibrazione la leva (301) di almeno una
5 struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) con una frequenza di vibrazione opportuna e si misurano variazioni di detta frequenza di vibrazione, indotte dal passaggio di uno spermatozoo.

7. Procedimento secondo la riv. 5 o 6, in cui:

10 • mediante procedura di calibrazione, si stabilisce un valore di soglia del segnale, prodotto da un campione di almeno una delle 2 tipologie di spermatozoi;

• la caratterizzazione e separazione avviene attraverso l'analisi della risposta rispetto al valore di
15 soglia predeterminato

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui si impiega più di una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

9. Apparecchiatura per il sessaggio di spermatozoi,
20 comprendente: una sorgente (2) di una popolazione mista di spermatozoi; almeno un elemento sensibile (30; 30a, 30b) atto a ricevere tali spermatozoi e a fornire una risposta diversa in presenza di uno spermatozoo portatore del cromosoma Y o di uno spermatozoo portatore del cromosoma X, secondo il
25 procedimento delle riv. da 1 a 8; mezzi (31, 5) di rilevamento e analisi di detta risposta; e mezzi (32a, 32b) di separazione degli spermatozoi portatori del cromosoma Y da quelli portatori del cromosoma X

10. Apparecchiatura secondo la riv. 9, caratterizzata dal
30 fatto che almeno un elemento sensibile (30; 30a, 30b) è un elemento che impiega almeno una struttura micrometrica a leva sospesa.

11. Apparecchiatura secondo la riv. 10, caratterizzata dal fatto che la leva (301) dell'almeno una struttura

micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) presenta un canale di microcircolazione fluidica (303; 303', 303", 303'''), in grado di lasciar transitare un solo spermatozoo per volta e presenta un ingresso collegato a detta sorgente di spermatozoi (2) e un'uscita collegata ai mezzi di separazione (32a, 32b).

12. Apparecchiatura secondo la riv. 11, caratterizzata dal fatto che detti mezzi di separazione (32a, 32b) sono controllati dai mezzi di rilevamento e analisi (31, 5) in modo da mettere normalmente in comunicazione l'uscita di detto canale (303; 303', 303", 303''') con una linea (9a, 9b) di trasporto di spermatozoi portatori del cromosoma Y, e da stabilire la comunicazione tra l'uscita di detto canale (303; 303', 303", 303''') e una linea (9a, 9b) di trasporto di spermatozoi portatori del cromosoma X in base ad un comando esplicito fornito da detti mezzi di rilevamento e analisi (31, 5).

13. Apparecchiatura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 10 a 12, caratterizzata dal fatto che detti mezzi di rilevamento e analisi (31, 5) sono atti a misurare flessioni della leva (301) dell'almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) indotte dal passaggio di uno spermatozoo.

14. Apparecchiatura secondo la riv. 13 in cui i mezzi di rilevamento consistono di una sorgente laser e di almeno un fotodiode.

15. Apparecchiatura secondo la riv. 13 in cui i mezzi di rilevamento consistono in almeno un elemento piezoresistivo integrato con la struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

16. Apparecchiatura secondo la riv. 13 in cui i mezzi di rilevamento consistono in almeno un elemento piezoelettrico integrato con la struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

17. Apparecchiatura secondo la riv. 13 in cui i mezzi di rilevamento consistono in almeno un condensatore, in cui una della armature coincide con la struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

5 18. Apparecchiatura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 10 a 12 caratterizzata dal fatto che almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) è collegata a mezzi per impartire alla leva (301) un'oscillazione con una frequenza di vibrazione opportuna, e
10 detti mezzi di rilevamento e analisi (31, 5) sono atti a misurare le variazioni della differenza di fase tra tale segnale di attuazione e segnale rilevato, indotte dal passaggio di uno spermatozoo.

19. Apparecchiatura secondo una qualsiasi delle
15 rivendicazioni da 10 a 12, caratterizzata dal fatto che detta almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) è collegata a mezzi per impartire alla leva (301) un'oscillazione con una frequenza di vibrazione opportuna, e detti mezzi di rilevamento e analisi (31, 5) sono atti a
20 misurare variazioni di tale frequenza di oscillazione della leva (301) indotte dal passaggio di uno spermatozoo.

20. Apparecchiatura secondo le riv. 18 o 19, in cui il mezzo per impartire alla leva una vibrazione consiste di un elemento piezoelettrico e i mezzi di rilevamento consistono
25 di almeno una sorgente laser e di un fotodiodo.

21. Apparecchiatura secondo la riv. 18 o 19, in cui il mezzo per impartire alla leva una vibrazione consiste di un elemento piezoelettrico e il mezzo di rilevamento consiste di almeno un elemento piezoresistivo integrato con la struttura
30 micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

22. Apparecchiatura secondo la riv. 18 o 19, in cui il mezzo per impartire alla leva una vibrazione consiste di un elemento piezoelettrico e il mezzo di rilevamento consiste di

un materiale piezoelettrico integrato con la struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

23. Apparecchiatura secondo la riv. 18 o 19, in cui il mezzo per impartire alla leva una vibrazione consiste di un
5 elemento piezoelettrico e il mezzo di rilevamento consiste di almeno un condensatore, in cui una delle armature coincide con la struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b).

24. Apparecchiatura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 23, caratterizzata dal fatto che detta
10 almeno una struttura micrometrica a leva sospesa (30; 30a, 30b) comprende un elemento singolo o più elementi a leva sospesa .

25. Apparecchiatura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 23, caratterizzata dal fatto di
15 comprendere una pluralità di strutture micrometriche a leva sospesa (30; 30a, 30b) collegate alla sorgente di spermatozoi (2) e ai mezzi di separazione (32a, 32b).

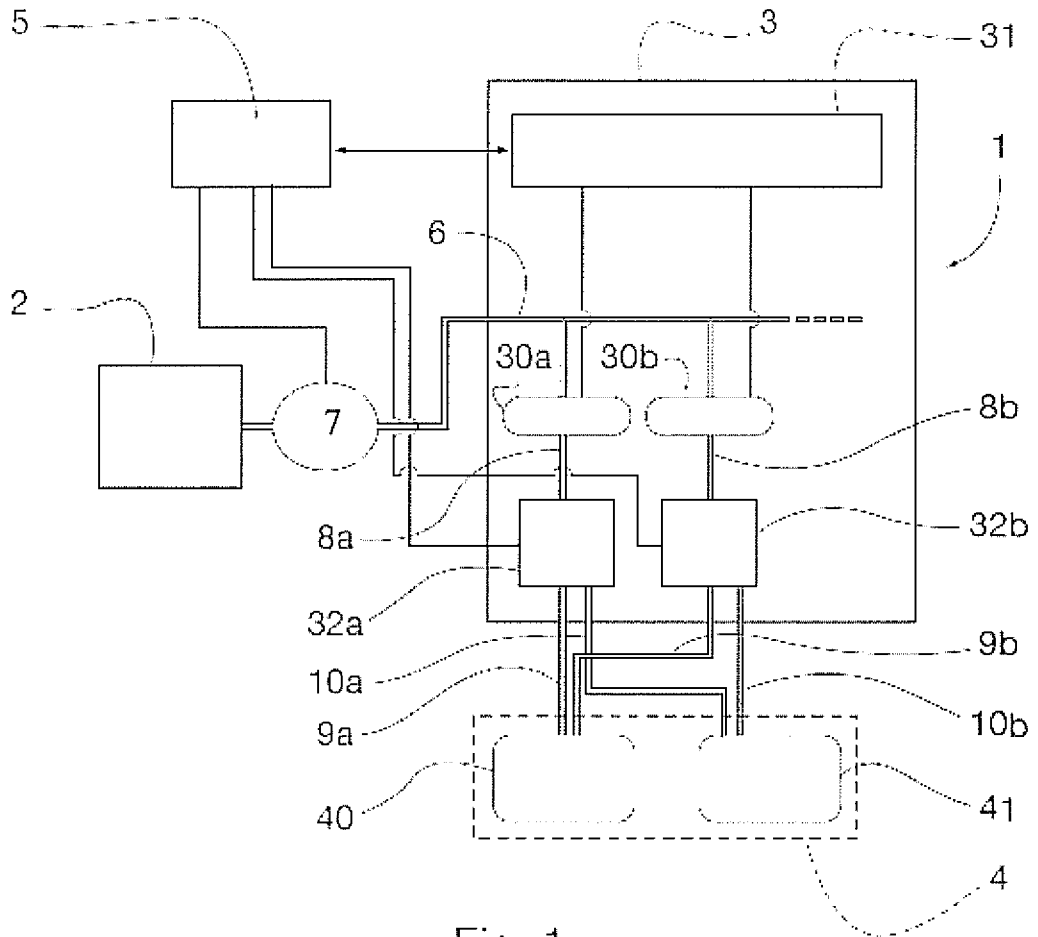


Fig. 1

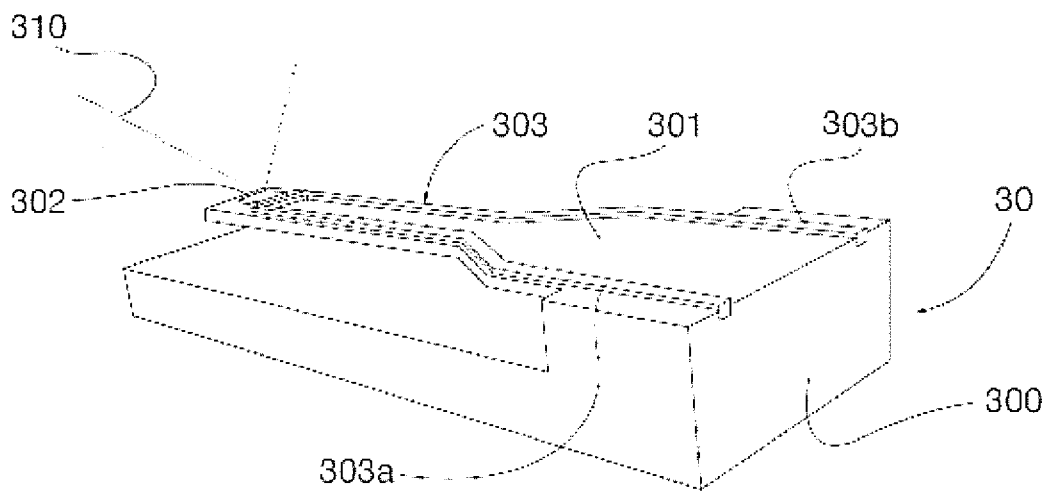


Fig. 2

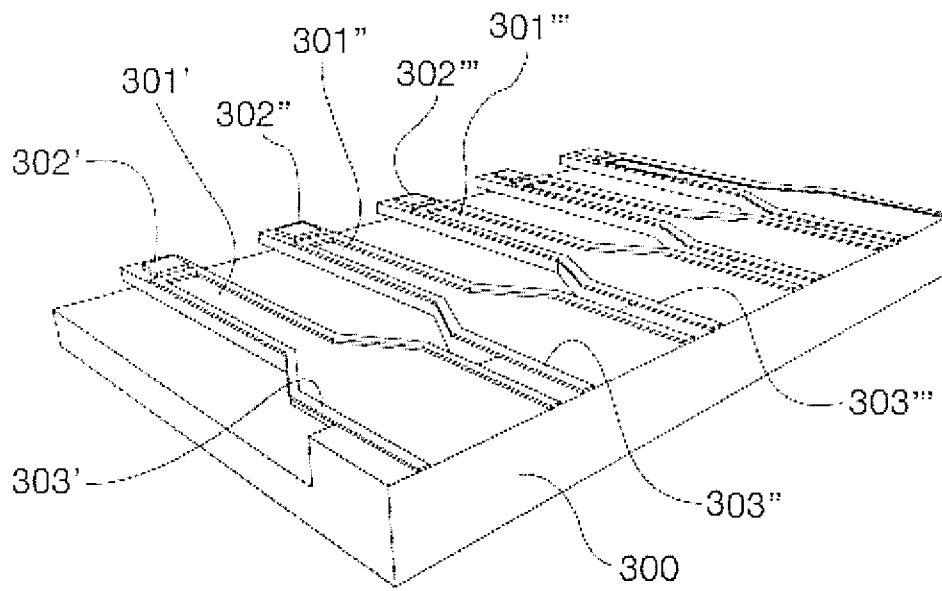


Fig. 3

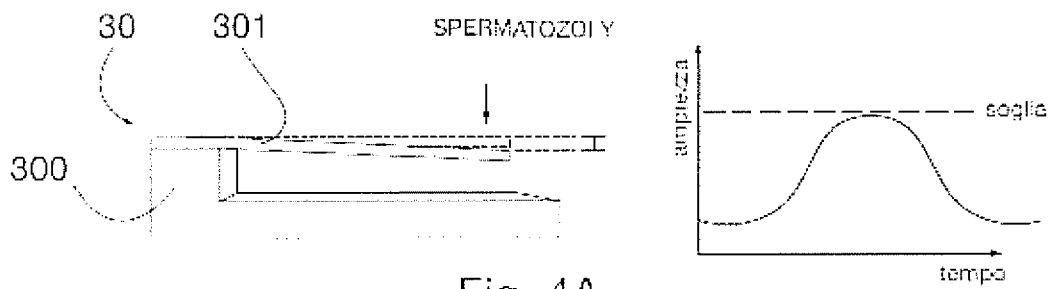


Fig. 4A

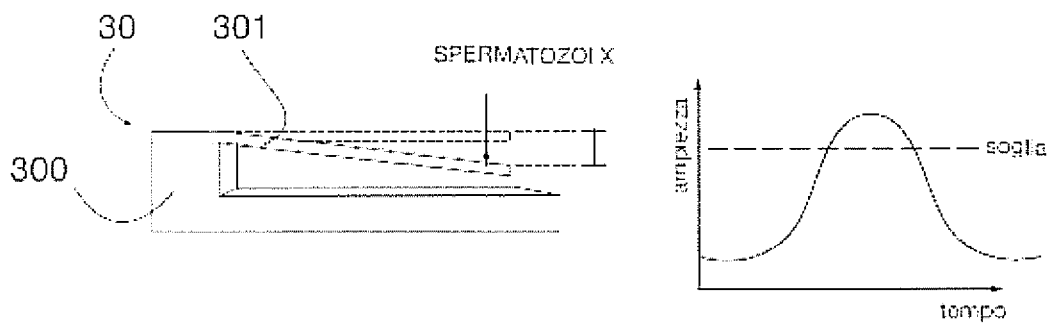


Fig. 4B

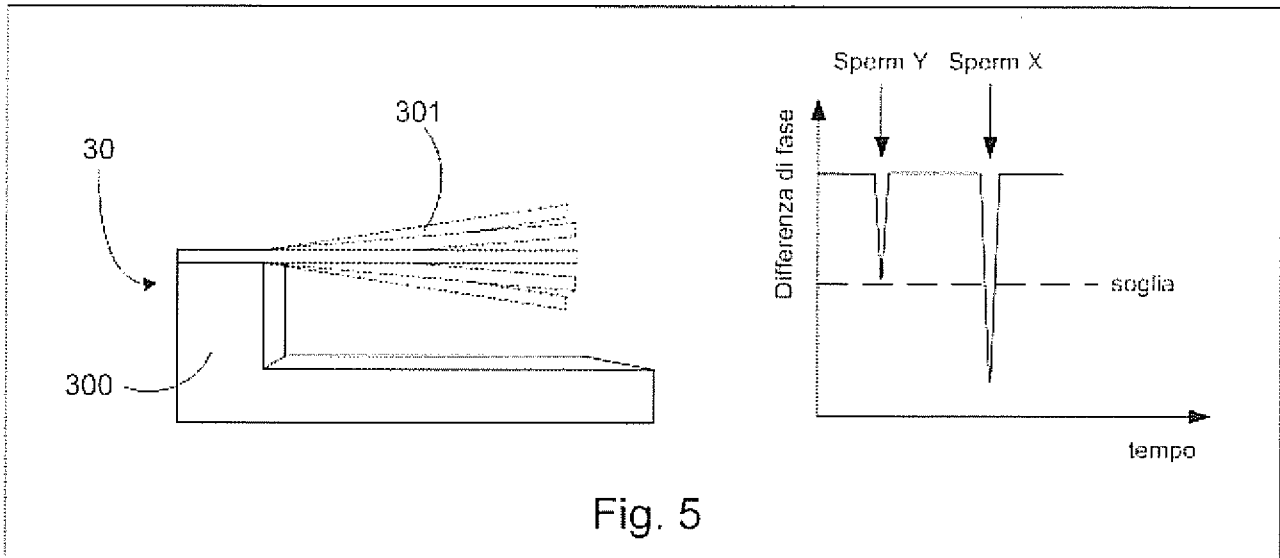


Fig. 5

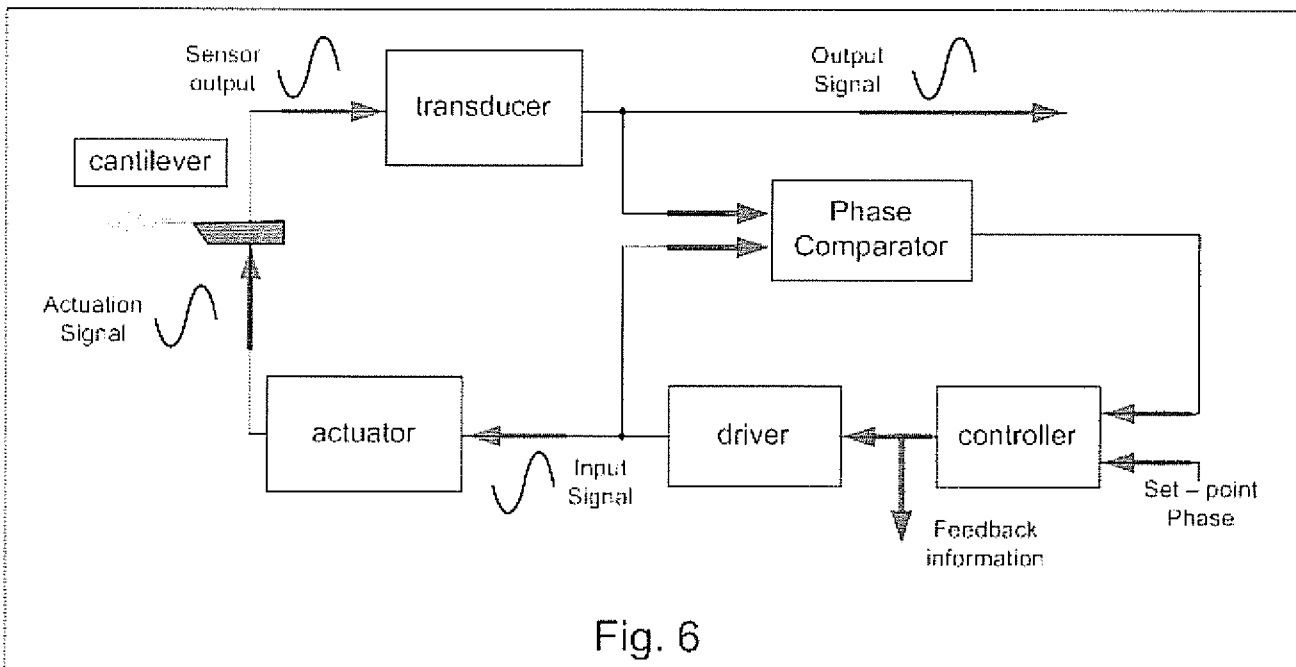


Fig. 6