

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902077281A1

Publication Date

20140210

Applicant

ISTITUTO SPERIMENTALE ITALIANO "LAZZARO SPALLANZANI"

Title

DISPOSITIVO E PROCESSO LABEL-FREE PER LA RILEVAZIONE E LA  
CARATTERIZZAZIONE DI FLUIDI MEDIANTE UN SISTEMA DI CIRCOLAZIONE  
MICROFLUIDICA SOSPESO E VIBRANTE

**“Dispositivo e processo label-free per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi  
mediante un sistema di circolazione microfluidica sospeso e vibrante”**

**“A label-free device and process for detecting and characterising fluids by means of a  
vibrating suspended microfluidic circulation system”**

5

**DESCRIZIONE**

**Settore Tecnico**

La presente invenzione si riferisce ad un dispositivo, ed al relativo processo, per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi, preferibilmente biologici, mediante un sistema di circolazione microfluidica sospeso e vibrante.

Precisamente, la presente invenzione si riferisce ad un dispositivo, ed al relativo processo, per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi, preferibilmente biologici, di tipo label-free, cioè senza marcatori fluorescenti o coloranti.

Più precisamente, la presente invenzione si riferisce ad un dispositivo, ed al relativo processo, per la rilevazione e la caratterizzazione di campioni monodispersi o polidispersi in un fluido mediante un meccanismo per l'induzione alla vibrazione di un determinato segmento sospeso di un sistema di circolazione microfluidica.

Ancora più precisamente, la presente invenzione si riferisce ad un dispositivo, ed al relativo processo, in grado di rendere direttamente sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico (nella presente descrizione anche denominato: linea microfluidica) attraverso l'applicazione di almeno due vincoli meccanici atti a comprendere e fissare detto segmento sospeso, detti vincoli potendo variare la loro posizione relativa lungo la direzione della linea microfluidica al fine di modificarne la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali.

La presente invenzione è specificamente indirizzata al “sorting” di un campione misto di spermatozoi, preferibilmente di spermatozoi bovini, il quale viene fatto transitare in detto segmento sospeso posto in risonanza.

**Arte Nota**

La necessità di sistemi di misura sempre più sensibili ed integrati ha indotto lo sviluppo di nuovi sensori, soprattutto nell'ambito delle nanotecnologie e più in generale nell'ambito delle tecnologie MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems, sistemi micro-elettro-meccanici). Tali nuovi sensori si prestano ad una serie di applicazioni fino a pochi anni fa impensabili ed,

infatti, molti di essi hanno trovato larga applicazione nel campo della misura di masse infinitesime, caratterizzazione e differenziazione della densità dei fluidi, citometria, eccetera.

Un esempio di dispositivo e metodo per misurare le proprietà dei fluidi mediante tecnologia MEMS è illustrato, ad esempio, nella domanda di Brevetto Internazionale pubblicata al n.

5 WO 2009/102796 A1; il dispositivo secondo detta domanda, che intende specificamente risolvere il problema delle perdite meccaniche dovute alla dissipazione dell'energia meccanica della struttura risonante nel supporto a cui essa è collegata, comprende una struttura tubolare che, a sua volta, comprende almeno una coppia di porzioni tubolari geometricamente parallele, sostanzialmente piane e fluidicamente connesse, detta struttura  
10 tubolare essendo configurata per il movimento vibrazionale e detto movimento vibrazionale verificandosi allorché un fluido scorre attraverso la struttura tubolare.

La citofluorimetria, differentemente da altri campi di applicazione, non presenta al momento tecnologie alternative valide e competitive, in grado di differenziare e caratterizzare il contenuto cromosomico delle cellule spermatiche, preferibilmente dei bovini, ai fini delle

15 attività di sessaggio; la citofluorimetria a flusso, infatti, rappresenta l'unico approccio tecnologico commercialmente utilizzabile per il sessaggio degli spermatozoi.

Tale tecnologia consente di misurare l'unica differenza al momento accertata sperimentalmente tra gli spermatozoi portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y; tale differenza consiste nella diversa quantità di DNA, stimata nell'ordine del

20 3 - 5%, associata principalmente alla diversa grandezza dei cromosomi sessuali e variabile a seconda della specie a favore del cromosoma X.

Il citofluorimetro a flusso è un dispositivo altamente tecnologico comprendente una o più sorgenti laser ed un sistema idrodinamico che immette le cellule campione in un flusso di liquido che incrocia un sistema di fasci laser e rivelatori di luce (fotodiodi e/o  
25 fotomoltiplicatori); il metodo di rivelazione della differenza di contenuto di DNA consiste nel colorare gli spermatozoi con un fluorocromo, che si lega stechiometricamente con il DNA, e nell'analizzare la quantità di luce che viene emessa per fluorescenza dalla cellula che incrocia il laser.

Nel tempo si sono susseguite una serie di modifiche migliorative per aumentare le  
30 prestazioni del citofluorimetro a flusso, il quale tuttavia non è esente da problematiche, tra le quali: il numero di spermatozoi separabili per unità di tempo; la colorazione del DNA degli spermatozoi, che non esclude effetti mutageni sulla cellula; la rivelazione della fluorescenza,

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

Si sono sperimentati vari metodi per il sessaggio degli spermatozoi alternativi alla tecnica della citofluorimetria a flusso, i quali si basano sulle differenze fenotipiche note tra gli spermatozoi portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y.

Le procedure per il sessaggio che utilizzano tecniche di centrifugazione e sedimentazione si basano sull'assunzione che gli spermatozoi X e Y abbiano una differente densità.

Nel 1982 Meistrich (come riportato da Windsor et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 155-171, 1993) considerando la differenza di DNA nota tra spermatozoi bovini X e Y, ha stimato una differenza di densità uguale  $7 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ , vale a dire lo 0,06% della densità di uno spermatozoo X.

Schwiderski et al., 1991, e Blottner et al., 1993, hanno utilizzato la centrifugazione in una soluzione di Percoll ad alto gradiente di densità per separare spermatozoi X e Y bovini, ottenendo un arricchimento del 75% della frazione di spermatozoi X nella parte inferiore e del 75% di Y in quella superiore.

In generale, gli esperimenti noti in letteratura non garantiscono la ripetibilità del metodo e soprattutto non è discussa la possibilità di sviluppo di un sistema commerciale per il sessaggio degli spermatozoi.

I progressi compiuti nel campo dei biosensori basati su dispositivi MEMS hanno mostrato la possibilità di misurare caratteristiche fisiche, quali per esempio massa e densità, anche di singole cellule.

Godin et al., 2007, *Appl. Phys. Lett.*, 91, descrivono le caratteristiche di un dispositivo capace di misurare la massa, la densità e la taglia di cellule e nanoparticelle, circolanti in un canale microfluidico incorporato in un microcantilever; i ricercatori hanno dimostrato la possibilità di misurare la densità con una risoluzione di  $10^{-4} \text{ g/cm}^3$ .

Nell'articolo di Burg et al. 2007, *Nature* 446:1066-1069 e nella domanda di Brevetto Internazionale pubblicata al n. WO 2008/045988 A1, si descrive in particolare la misura di massa con la risoluzione del femtogrammo ( $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$ ).

Nella domanda di Brevetto Italiano n. TO2008A101 si presenta un procedimento ed una apparecchiatura per il sessaggio degli spermatozoi in funzione della differenza di massa; l'apparecchiatura proposta consiste essenzialmente di un sensore micromeccanico cantilever con un sistema di fluidica integrato, indotto ad oscillare alla propria frequenza di risonanza:

il passaggio di una cellula campione all'interno del canale fluidico altera l'oscillazione del risonatore e tale variazione risulta infine proporzionale alla massa, oppure alla densità, della particella.

Inoltre nella domanda di Brevetto Internazionale pubblicata al n. WO 2012/014142 A1 viene mostrata una procedura per il sessaggio degli spermatozoi che non richiede una calibrazione del dispositivo, volta alla determinazione della relazione tra la variazione di una caratteristica dell'oscillazione del cantilever e la massa transitante.

Altri esempi di dispositivi e metodi per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi biologici sono illustrati, ad esempio, nella domanda di Brevetto Statunitense pubblicata al n. US 2010/0015649 A1 e nel Brevetto Statunitense n. US 5,211,829.

Il documento n. US 2010/0015649 A1 mostra un sensore atto a monitorare i cambiamenti di densità e/o viscosità di un campione di fluido prima, durante e dopo una reazione chimica, detto dispositivo comprendendo una pluralità di strati di cui uno dotato di un supporto di base, almeno due elementi lamellari uniti al supporto di base in corrispondenza di ciascuna loro estremità, almeno un elemento capace di indurre una vibrazione per provocare l'oscillazione selettiva di almeno uno degli elementi lamellari ed un elemento sensore per determinare la frequenza di oscillazione di almeno uno degli elementi lamellari.

Il documento n. US 5,211,829 descrive un'apparecchiatura analitica dotata di un tubo capillare attraverso cui può fluire un campione di fluido, detto tubo capillare essendo vincolato in corrispondenza di due suoi punti in modo da definire una sezione di rilevazione in grado di vibrare, di mezzi d'irraggiamento per indurre la vibrazione di detta sezione di rilevazione e di mezzi di rilevazione per rilevare la vibrazione meccanica del tubo capillare nella sezione di rilevazione.

Le soluzioni finora proposte, tuttavia, non rispondono in maniera soddisfacente al problema di misurare e caratterizzare un campione di spermatozoi misti, che resta pertanto un'esigenza ancora irrisolta.

In particolare resta un'esigenza ancora irrisolta quella di misurare e caratterizzare un campione di spermatozoi misti mediante una tecnica di tipo label-free.

Inoltre, non sono ancora state individuate soluzioni in grado di rendere direttamente sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico, anche modificandone la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali.

Si intende qui precisare che, nella presente descrizione, l'espressione "direttamente sensibile" significa che un segmento sospeso di una linea capillare microfluidica viene reso sensibile senza l'aggiunta di ulteriori elementi sensibili, ma solo attraverso l'interfacciamento con opportuni attuatori, rivelatori e sistemi di controllo in grado di stimolare, il suddetto  
 5 segmento e leggerne e controllarne le variazioni meccaniche; in tal modo è possibile utilizzare un unico dispositivo in grado di operare con diversi intervalli di sensibilità secondo diverse esigenze di misura senza dover, di volta in volta, riprogettare e realizzare il sensore dedicato.

Infine, un ulteriore problema riguarda la disponibilità di un dispositivo adatto ad effettuare  
 10 sia il "sorting" di un campione misto di spermatozoi sia il conteggio di microparticelle e nanoparticelle, la rivelazione e separazione di particelle mono/polidisperse, gas, misure di densità dei fluidi ed applicazioni citometriche in generale.

#### **Scopi e Descrizione Sintetica dell'Invenzione**

La presente invenzione, partendo dalla nozione degli inconvenienti e delle carenze della  
 15 tecnica nota, intende porvi rimedio.

In particolare, la presente invenzione affronta i seguenti problemi che risultano essere irrisolti o risolti in maniera ancora non completa e soddisfacente dalle soluzioni tecniche precedenti:

- misurare e caratterizzare un campione di spermatozoi misti, specificamente mediante  
 20 una tecnica di tipo label-free;
- rendere direttamente sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico, anche modificandone la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali, senza l'aggiunta di ulteriori elementi sensibili, in tal modo potendo utilizzare un unico dispositivo in grado di operare con diversi intervalli di sensibilità secondo diverse esigenze di misura senza  
 25 dover, di volta in volta, riprogettare e realizzare il sensore dedicato;
- controllare l'attuazione della vibrazione e la rivelazione della vibrazione stessa in modo integrato, al fine di ottenere un valore misurabile delle variazioni di almeno una delle caratteristiche dell'oscillazione, ad esempio causate dalla variazione della densità di massa del fluido compreso in un segmento di linea microfluidica;
- 30 - effettuare il "sorting" di un campione misto di spermatozoi;

- effettuare anche il conteggio di microparticelle e nanoparticelle, la rivelazione e separazione di particelle mono/polidisperse, misure di densità dei fluidi ed applicazioni citometriche in generale.

Pertanto, uno scopo dell'invenzione è provvedere un dispositivo, ed il relativo processo, per  
5 misurare e caratterizzare un campione di spermatozoi misti, specificamente mediante una tecnica di tipo label-free.

Più precisamente la presente invenzione fornisce un dispositivo, ed il relativo processo, in grado di rendere direttamente sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico di dimensione determinata grazie all'applicazione di almeno due vincoli meccanici atti a  
10 comprendere e fissare detto segmento sospeso, detti vincoli potendo distanziarsi mediante un sistema di movimentazione micrometrica manuale od automatico, lungo la direzione della linea microfluidica, al fine di modificarne la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali e detto segmento essendo forzato ad oscillare meccanicamente da un dispositivo attuatore, mediante un opportuno sistema di feedback e controllo, alla frequenza propria di risonanza,  
15 detti vincoli meccanici potendo essi stessi anche agire da punti di trasmissione dell'attuazione.

Ancora più precisamente la presente invenzione fornisce un dispositivo, ed il relativo processo, di tipo label-free per il rilevamento e la caratterizzazione di campioni monodispersi o polidispersi in un fluido, mediante un meccanismo per l'induzione alla  
20 vibrazione di un determinato segmento preesistente di linea capillare microfluidica.

Un altro scopo della presente invenzione, conseguito parallelamente, è provvedere un dispositivo, ed il relativo processo, integrato ad un sistema di controllo e di rivelazione della vibrazione meccanica al fine di ottenere un valore misurabile delle variazioni di almeno una delle caratteristiche dell'oscillazione, ad esempio causate dalla variazione della densità di  
25 massa del fluido compreso in un segmento di linea.

Più precisamente, un sistema di rivelazione della vibrazione meccanica è integrato al dispositivo al fine di ottenere un valore misurabile delle variazioni di almeno una delle caratteristiche dell'oscillazione, causate dalla variazione della densità di massa del fluido compreso nel segmento di linea.

30 La presente invenzione è in primo luogo finalizzata al "sorting" di un campione misto di spermatozoi, ma può essere impiegata anche in applicazioni quali il conteggio di

microparticelle e nanoparticelle, la rivelazione e separazione di particelle mono/polidisperse, misure di densità dei fluidi ed applicazioni citometriche in generale.

Più precisamente, in un caso di specifico interesse, l'elemento sensibile, realizzato attraverso l'applicazione del predetto meccanismo, permette di effettuare il "sorting" di un campione misto di spermatozoi, preferibilmente di spermatozoi bovini, che viene fatto transitare nel suddetto segmento sospeso posto in risonanza.

La differenziazione degli spermatozoi può avvenire: 1) in modalità statica, tramite la rivelazione della deflessione del detto segmento al passaggio degli spermatozoi nel sistema di circolazione; 2) e ancor meglio in modalità dinamica, tramite la rilevazione della variazione della differenza di fase tra un segnale di attuazione per la messa in oscillazione del segmento e quello di risposta del trasduttore, oppure della variazione della frequenza di risonanza del suddetto segmento.

Un non ultimo scopo della presente invenzione è provvedere un dispositivo, ed il relativo processo, economici e di semplice realizzazione.

In vista di tali scopi, la presente invenzione provvede un dispositivo ed il relativo processo aventi, rispettivamente, le caratteristiche delle allegate rivendicazioni 1 e 7, cui si rinvia per brevità espositiva; inoltre, la presente invenzione provvede anche l'uso di detti dispositivo e processo specificamente per il "sorting" di un campione misto di spermatozoi avente le caratteristiche dell'allegata rivendicazione 10, cui si rinvia per brevità espositiva.

È, dunque, un primo oggetto della presente invenzione, eventualmente indipendente ed utilizzabile autonomamente rispetto agli altri aspetti dell'invenzione, un dispositivo, ed il relativo processo, per misurare e caratterizzare un campione di spermatozoi misti, specificamente mediante una tecnica di tipo label-free.

È, dunque, un altro oggetto della presente invenzione, eventualmente indipendente ed utilizzabile autonomamente rispetto agli altri aspetti dell'invenzione, un dispositivo, ed il relativo processo, in grado di rendere direttamente sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico di dimensione determinata grazie all'applicazione di almeno due vincoli meccanici atti a comprendere e fissare detto segmento sospeso, detti vincoli potendo distanziarsi mediante un sistema di movimentazione micrometrica manuale od automatico, lungo la direzione della linea, al fine di modificarne la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali e detto segmento essendo forzato ad oscillare meccanicamente da un dispositivo attuatore, mediante un opportuno sistema di feedback e controllo, alla frequenza propria di



risonanza, detti vincoli meccanici potendo essi stessi anche agire da punti di trasmissione dell'attuazione.

È, dunque, un altro oggetto della presente invenzione, eventualmente indipendente ed utilizzabile autonomamente rispetto agli altri aspetti dell'invenzione, un dispositivo, ed il relativo processo, integrato ad un sistema di controllo e di rivelazione della vibrazione meccanica al fine di ottenere un valore misurabile delle variazioni di almeno una delle caratteristiche dell'oscillazione, ad esempio causate dalla variazione della densità di massa del fluido compreso in un segmento di linea.

È, dunque, un altro oggetto della presente invenzione, eventualmente indipendente ed utilizzabile autonomamente rispetto agli altri aspetti dell'invenzione, l'uso di un dispositivo, ed il relativo processo, per effettuare il "sorting" di un campione misto di spermatozoi.

Ulteriori caratteristiche tecniche vantaggiose di dettaglio del dispositivo e del relativo processo, nonché della loro specifica applicazione per il "sorting" di un campione misto di spermatozoi secondo la presente invenzione, sono descritte nelle corrispondenti rivendicazioni dipendenti.

Le suddette rivendicazioni, nel seguito definite, si intendono parte integrante della presente descrizione.

Come risulterà evidente dalla descrizione dettagliata che segue, il dispositivo ed il relativo processo secondo la presente invenzione, presentano significativi vantaggi in particolare rispetto alle tecnologie esistenti MEMS e della citofluorimetria a flusso.

### **Descrizione delle Figure**

La presente invenzione, unitamente ai suoi scopi e vantaggi, risulterà maggiormente evidente dalla descrizione dettagliata che segue, relativa a forme di realizzazione preferite del dispositivo e del relativo processo qui rivendicati in esclusiva, date a titolo indicativo ed esemplificativo, ma non limitativo, con riferimento alle tavole di disegno allegate, anch'esse fornite a solo titolo di esempio, in cui:

- la Fig. 1 è una vista prospettica di un segmento di linea microfluidica funzionalizzato secondo la presente invenzione;
- la Fig. 2A è una vista laterale di Fig. 1, in cui si evidenzia la direzione in cui i vincoli meccanici possono distanziarsi;
- la Fig. 2B è una vista dall'alto di Fig. 1;

- la Fig. 3 è una rappresentazione CAD (Computer-Aided Design) di un sistema ottico di rivelazione della vibrazione meccanica del segmento sospeso di linea microfluidica secondo la presente invenzione;

- la Fig. 4A illustra una prima forma di realizzazione della presente invenzione, con configurazione in serie di segmenti di linea microfluidica funzionalizzati;

- la Fig. 4B illustra una seconda forma di realizzazione della presente invenzione, con configurazione in parallelo di segmenti di linea microfluidica funzionalizzati;

- la Fig. 5 mostra una realizzazione prototipale di un segmento di microcapillare in oscillazione secondo la presente invenzione;

- la Fig. 6 è un grafico riportante misure sperimentali relative alla variazione del ritardo di fase tra segnale di attuazione ed oscillazione al passaggio di una particella di calibrazione all'interno di un segmento di linea secondo la presente invenzione; e

- la Fig. 7 è uno schema di funzionamento del sistema per il "sorting" di un campione misto di spermatozoi, comprendente il segmento di linea microfluidica funzionalizzato secondo la presente invenzione.

Questi disegni illustrano diversi aspetti e forme di realizzazione della presente invenzione e, se del caso, strutture, componenti, materiali e/o elementi simili sono indicati in figure differenti con gli stessi riferimenti numerici.

#### **Descrizione Dettagliata dell'Invenzione**

Mentre l'invenzione è suscettibile di varie modifiche ed implementazioni alternative, alcune sue forme di realizzazione verranno descritte nel seguito dettagliatamente, in particolare mediante alcuni esempi illustrativi.

Si dovrebbe comprendere, tuttavia, che non vi è alcuna intenzione di limitare la presente invenzione alle forme specifiche descritte ma, al contrario, l'invenzione intende coprire tutte le modifiche, implementazioni alternative ed equivalenti che rientrano nell'ambito di protezione dell'invenzione come definito nelle annesse rivendicazioni.

Nella seguente descrizione, pertanto, l'uso di "ad esempio", "ecc." ed "o" indica alternative non esclusive senza alcuna limitazione, salvo diversa indicazione.

L'uso di "anche" significa "tra cui, ma non limitato a," se non diversamente indicato.

Con riferimento alla Figura 1 viene descritta una forma di realizzazione preferita della presente invenzione e, precisamente, un dispositivo sensibile per il "sorting" di un campione misto di spermatozoi.

Per “sorting” si intende la separazione di un campione misto nelle due popolazioni di spermatozoi portatori del cromosoma X e di quelli portatori del cromosoma Y, in base alla differenza di massa, oppure di densità, tra gli spermatozoi stessi.

Il procedimento di “sorting” consiste nel far fluire, all’interno del sistema di circolazione microfluidica, un campione misto di spermatozoi in sospensione in un liquido di trasporto. Tale sistema fluidico è disegnato in modo tale da permettere il transito di un singolo spermatozoo per volta all’interno del segmento di linea, funzionalizzato secondo il meccanismo descritto nel dettaglio precedentemente. Il passaggio di un singolo spermatozoo determina una variazione locale della densità di massa del liquido di trasporto, la quale determina la variazione di una caratteristica dell’oscillazione del segmento di linea. La selezione (“sorting”) del campione si determina in funzione della bimodalità della distribuzione delle occorrenze delle misure relative ad una delle variazioni caratteristiche dell’oscillazione. In particolare, la calibrazione del dispositivo su un valore di soglia, predeterminato dal passaggio di un campione di spermatozoi appartenenti ad una singola popolazione, permette separazione in tempo reale di un campione misto, dal confronto del segnale misurato con quello di soglia.

Detto dispositivo 1 comprende una linea microfluidica 20 dotata di un ingresso 23A ed una uscita 23B, in cui fluisce un fluido di trasporto contenente in sospensione gli spermatozoi. Detta linea microfluidica 20 viene vincolata in corrispondenza di due punti 21A e 21B, in modo da selezionare un segmento 10 della stessa di lunghezza determinata, mediante i due vincoli 26, 28,.

Detti vincoli 26, 28 garantiscono il serraggio con detta linea microfluidica 20 tra i punti 21A, 21B e l’interfaccia meccanica con l’intera struttura sottostante composta dalle parti 22, 27, 29A e 29B. Il suddetto segmento 10 può essere serrato ai vincoli attraverso diversi possibili sistemi di fissaggio quali, ad esempio:

- a) microgripping meccanici, piezoelettrici o elettromeccanici,
- b) pneumatici,
- c) magnetici,
- d) chimici (ad esempio utilizzando materiali adesivi).

È preferibile l’uso di vincoli con meccanismi di interfaccia come sopra identificati nei punti da a) a c) che permettono, inoltre, una facile intercambiabilità del microcapillare ed un riutilizzo del dispositivo in caso di degradazione della linea fluidica.

Come illustrato in Figura 2A, detti vincoli 26, 28 possono essere predisposti per la movimentazione secondo le direzioni indicate dalle frecce 24A e 24B, per esempio attraverso un meccanismo di movimentazione elettromeccanica; in una particolare configurazione i vincoli meccanici 26, 28 possono essere movimentati lungo un binario di scorrimento 27. In tal modo è possibile distanziare la coppia di vincoli meccanici 26, 28 lungo le direzioni 24A e 24B, mediante un sistema micrometrico automatico o manuale, in modo da predisporre diverse lunghezze del tratto di segmento sospeso 10 della linea microfluidica 20 e quindi diverse frequenze operative proprie di risonanza.

Si ritiene qui utile evidenziare che, grazie all'accorgimento sopra descritto, è possibile utilizzare un unico dispositivo 1 comprendente il segmento sospeso 10 della linea capillare microfluidica 20 reso sensibile ed in grado di operare con diversi intervalli di sensibilità secondo diverse esigenze di misura senza dover, di volta in volta, riprogettare e realizzare il sensore dedicato.

Il segmento 10 di linea microfluidica 20 è sospeso tra i vincoli 26 e 28 per l'intera lunghezza del segmento; inoltre, detti vincoli sono connessi meccanicamente al dispositivo 22 che funge da attuatore meccanico ed è compreso tra i substrati 29A e 29B. Il suddetto dispositivo 22, induce l'oscillazione della struttura composta dal substrato 29A, dai vincoli 26, 28 e dal segmento 10 della linea microfluidica 20, determinando la vibrazione dell'elemento risonante 10. Il substrato 29B deve essere fissato, ad esempio ad una base di appoggio, al fine di garantire che l'escursione meccanica dell'attuatore 22 coinvolga solo la struttura al di sopra di detto attuatore e non disperda parte del moto verso il basso. L'attuatore 22 può consistere di un elemento piezoelettrico, indotto a vibrare nella direzione ortogonale rispetto alla lunghezza del segmento sospeso 10.

Il sistema descritto forza il segmento 10 di linea microfluidica 20 ad oscillare alla frequenza di attuazione, come viene di seguito chiarito.

Il dispositivo attuatore, che può essere disposto, integrato o configurato in modi differenti, rispetto a quanto riportato nelle figure, a seconda del principio di funzionamento, è scelto tra:

- almeno un elemento piezoelettrico solidale ai vincoli meccanici 26, 28;
- un dispositivo di attuazione elettromagnetica;
- un dispositivo di attuazione elettrostatica;
- un dispositivo di attuazione termica;

- un dispositivo di attuazione ottica;
- almeno una coppia dei suddetti vincoli 26, 28.

Considerando un segmento di linea microfluidica di forma cilindrica, caratterizzato da una lunghezza  $l$ , da un raggio esterno  $r_{ext}$  e da un raggio interno  $r_{int}$ , dalla equazione di Eulero -

5 Bernoulli si ricavano le frequenze di risonanza del segmento:

$$f_n = \frac{\lambda_n^2}{2\pi l^2} \sqrt{\frac{EI_z}{\rho A}}$$

dove si è indicato con:  $\lambda_n$  delle costanti note come parametri modali,  $E$  il modulo di Young del materiale costituente il segmento di linea microfluidica,  $\rho$  la densità, l'area della sezione trasversale  $A = \pi(r_{ext}^2 - r_{int}^2)$  e il momento secondo di inerzia  $I_z = \pi/4(r_{ext}^4 - r_{int}^4)$ .

10 Questo risultato comporta che la struttura può vibrare in determinati modi di vibrazione, ad ognuno dei quali corrisponde una determinata configurazione spaziale. Ogni modo di vibrazione è caratterizzato da un certo numero di nodi, che aumentano all'aumentare di  $n$ .

Come visibile nelle Figure 2A e 2B, grazie alla soluzione tecnologica proposta secondo la presente invenzione, la linea microfluidica stessa diventa direttamente sensibile al passaggio

15 di una particella, ad esempio di uno spermatozoo, 25 all'interno del fluido circolante nella linea. Infatti, il passaggio di una particella sospesa nel fluido di trasporto determina una variazione locale di almeno una caratteristica fisica del segmento di linea sospeso e oscillante. A titolo di esempio, una caratteristica fisica osservabile è la variazione locale della massa del segmento di linea, dovuta alla differenza di densità tra fluido di trasporto e

20 particella in transito. La variazione locale della massa si esplicita nella variazione della frequenza di risonanza e nella variazione del ritardo di fase tra attuazione e oscillazione del segmento di linea microfluidica oscillante.

Considerando un modello "*mass - spring*" la frequenza di risonanza del segmento di linea microfluidica può essere scritto come:

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_{eff}}}$$

25

dove con  $k = 192 \cdot EI_z / l^3$  si indica la costante elastica e con  $m_{eff} = 192 / \lambda_n^4 \cdot m_0$  si indica la cosiddetta massa efficace del segmento di linea microfluidica. Considerando invariata la costante elastica e differenziando rispetto alla massa, si ottiene la variazione della frequenza di risonanza  $f_n$  secondo la relazione:

$$\Delta f_n = -\frac{f_n}{2 m_{eff}} \Delta m$$

Tale relazione approssimata ha una validità pratica mettendo in relazione lineare la variazione, anche locale, della massa della linea microfluidica sospesa con la variazione della frequenza di risonanza.

- 5 La vibrazione meccanica del segmento 10 di linea microfluidica 20 viene misurata attraverso un sistema di rivelazione.

In Figura 3 viene fornito a titolo di esempio non limitativo un possibile sistema di rivelazione della vibrazione meccanica del segmento 10 di linea microfluidica 20. Tale sistema si compone di una sorgente laser 60, il cui fascio è indirizzato sulla superficie del segmento 10 di linea microfluidica 20 oscillante alla frequenza di risonanza. Il segmento 10 è vincolato dal sistema di fissaggio 21A e 21B e la vibrazione meccanica è indotta da un supporto piezoelettrico 22. Tale oscillazione determina la variazione della direzione del fascio laser trasmesso, riflesso, oppure deflesso. Dopo che il fascio ha incrociato il segmento 10 di linea oscillante, la posizione del laser viene rilevata da un sensore di luce, nell'esempio descritto il fotodiodo 61, in maniera tale da ottenere una tensione elettrica alternata, oscillante alla stessa frequenza di vibrazione meccanica del segmento 10 di linea microfluidica 20.

Secondo un'altra tecnica di rivelazione, il laser incidente sulla superficie del segmento 10 di linea microfluidica 20 è focalizzato in modo da proiettare l'immagine occultata (ombra del microcapillare) del laser sull'area sensibile del fotodiodo 61. L'oscillazione del capillare indurrà una variazione della distribuzione dell'immagine sul fotodiodo determinando in uscita un segnale elettrico alternato. Il vantaggio di questa soluzione tecnica permette, in caso di microcapillari trasparenti, di evitare falsi segnali positivi dovuti a fenomeni di scattering del laser incidente su uno spermatozoo in transito.

Detto sistema di rivelazione della vibrazione meccanica può però comprendere almeno una tra le seguenti alternative:

- almeno una sorgente laser ed almeno un fotodiodo;
- almeno un condensatore;
- almeno un elemento piezoresistivo integrato con detto segmento sospeso 10;
- almeno un elemento piezoelettrico integrato con detto segmento sospeso 10.

La tecnologia proposta nell'invenzione permette inoltre di configurare segmenti di linea microfluidica in elementi multipli, atti alla rilevazione del passaggio di uno spermatozoo.

In particolare, a titolo di esempio, si illustra in Figura 4A una configurazione in serie di segmenti di linea microfluidica tali da permettere misure in sequenza sullo stesso campione  
5 in esame.

Inoltre in Figura 4B si illustra una configurazione in parallelo, che permette di aumentare il "rate" del numero di campioni da analizzare e trattare.

In Figura 5 si riporta l'immagine fotografica di uno dei primi prototipi, realizzato per lo studio di fattibilità della presente invenzione.

10 In Figura 6 si mostrano i primi dati sperimentali per la validazione della presente invenzione e relativi alle misure della variazione di fase tra segnale di attuazione e segnale di oscillazione di un prototipo di segmento di microcapillare sospeso e vincolato in due estremi.

In particolare, il suddetto segmento microcapillare, di vetro borosilicato, ha una lunghezza di  
15 500  $\mu\text{m}$  ed una sezione cava avente diametro interno pari a 8  $\mu\text{m}$  e diametro esterno pari a 10  $\mu\text{m}$ . La frequenza fondamentale dell'elemento risonante, riempito di olio di paraffina, misurata sperimentalmente è risultata pari a circa 241 KHz.

Il segmento di linea microfluidica è stato posto in risonanza mediante un attuatore piezoelettrico alimentato con un generatore di funzioni. Il generatore di funzioni è stato  
20 programmato per erogare una tensione sinusoidale tra +10V e -10V. Un laser incidente, con lunghezza d'onda di 635 nm, è stato fatto incidere trasversalmente alla lunghezza del segmento sospeso. La luce diffusa dal suddetto segmento, così come in Figura 3, è stata focalizzata sull'area sensibile di un fotodiodo PSD (Position Sensor Detector) a quattro quadranti. Il segnale in uscita dal PSD è stata confrontata con il segnale di attuazione, al fine  
25 di determinare la variazione del ritardo di fase tra i due segnali.

La variazione del ritardo di fase è indotta dal passaggio di sfere calibratrici in resina di melammina, di densità e dimensioni note, in un fluido di trasporto costituito da olio di paraffina.

Come si osserva dai risultati riportati in Figura 6, il passaggio di una particella all'interno del  
30 segmento determina una variazione temporanea del ritardo di fase rispetto al segnale di attuazione. In alternativa è possibile determinare la variazione della frequenza di risonanza indotta dal passaggio del campione attraverso il segmento risonante.

Il dispositivo secondo la presente invenzione, pertanto, permette che la caratteristica dell'oscillazione misurata sia:

- la variazione del ritardo di fase tra attuazione e oscillazione del segmento sospeso 10, oppure

5 - la variazione della frequenza di risonanza di detto segmento 10.

Preferibilmente, il dispositivo secondo la presente invenzione, consente di rivelare la variazione densità di massa.

Inoltre, preferibilmente, il dispositivo secondo la presente invenzione è chiuso in una cella ermetica sotto vuoto per il controllo delle condizioni termodinamiche e la riduzione degli  
10 effetti di viscosità del mezzo in cui detto segmento 10 vibra.

Il "sorting" di un campione misto di spermatozoi si determina in funzione della bimodalità della distribuzione degli eventi relativi alla misura di una delle variazioni caratteristiche dell'oscillazione del segmento di linea causate dal passaggio di uno spermatozoo, quali per  
15 esempio la frequenza di risonanza o la variazione del ritardo di fase tra oscillazione e attuazione della stessa.

In un altro aspetto l'invenzione fornisce un processo label-free per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi biologici mediante un sistema di circolazione microfluidica sospeso e vibrante.

Specificamente, la presente invenzione fornisce un processo in grado di rendere direttamente  
20 sensibile un segmento sospeso di un capillare microfluidico attraverso l'applicazione di almeno due vincoli meccanici atti a comprendere e fissare detto segmento sospeso, detti vincoli potendo variare la loro posizione relativa lungo la direzione della linea microfluidica al fine di modificarne la lunghezza e le caratteristiche vibrazionali.

Detto processo, dunque, comprende le fasi di:

- 25 i. predisporre una linea microfluidica dotata di ingresso ed uscita;  
ii. predisporre un supporto dotato di almeno due vincoli meccanici;  
iii. intercettare un segmento sospeso di detta linea microfluidica tra detti due vincoli meccanici, così rendendo direttamente sensibile detto segmento sospeso;  
iv. predisporre un fluido, preferibilmente biologico, e farlo fluire attraverso detto  
30 segmento sospeso di detta linea microfluidica;  
v. indurre la vibrazione di detto segmento sospeso, così rilevando e caratterizzando detto fluido biologico.



Preferibilmente, detto fluido è un campione biologico di spermatozoi misti e detto processo è atto ad effettuarne il “sorting”.

Più precisamente, detto campione è scelto tra:

- a. un fluido biologico consistente in una popolazione mista di spermatozoi, costituita di spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi portatori del cromosoma Y ed in cui la proprietà rivelata è la differenza di massa o di densità tra spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi portatori del cromosoma Y;
- b. fluidi in cui siano presenti in sospensione cellule, batteri, virus, pollini in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità;
- c. fluidi in cui siano sospesi o diluiti micro e nano particelle, composti chimici, polveri e fluidi di diversa natura in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità;
- d. gas in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità.

Secondo il processo della presente invenzione la caratteristica misurata è una tra:

- la variazione del ritardo di fase tra attuazione e oscillazione di detto segmento sospeso;
- la variazione della frequenza di risonanza di detto segmento sospeso;
- la flessione statica di detto segmento sospeso senza induzione della vibrazione.

In un altro aspetto l'invenzione è rivolta all'uso del dispositivo 1 e del relativo processo, in precedenza dettagliatamente descritti, per il “sorting” di un campione misto di spermatozoi; in particolare la presente invenzione fornisce una apparecchiatura 100, illustrata a titolo di esempio in Figura 7, per la separazione in tempo reale di un campione misto di spermatozoi nella popolazione degli spermatozoi portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y. Detta apparecchiatura 100 comprende un “reservoir” 30 che contiene il fluido di trasporto, caratterizzato da un valore noto della densità, circolante nella linea microfluidica ed un “reservoir” 31 che contiene una sospensione di un campione misto di spermatozoi immerso nello stesso fluido di trasporto. Le valvole 40 e 41 regolano il flusso rispettivamente della linea contenente il campione e della linea principale del fluido di trasporto, in modo da regolare la velocità di immissione dei campioni nella linea microfluidica. Un chip microfluidico per il mescolamento del fluido di trasporto e della sospensione con il campione di spermatozoi, 50 si compone di un ingresso principale 54B per il fluido di trasporto e di un ingresso secondario 54A per il campione misto di spermatozoi,

nonché di una uscita 54C. La linea secondaria si innesta nel flusso principale, mescolando i due fluidi. Una volta in uscita dal punto 54C, il fluido attraversa il dispositivo 1, funzionalizzato secondo la soluzione tecnica descritta dettagliatamente in precedenza. Il passaggio di uno spermatozoo 25 viene rilevato dal segmento 10 di linea, poiché alterando le proprietà fisiche del segmento, per esempio la variazione locale della massa, ne determina una variazione delle caratteristiche della vibrazione. Successivamente il segnale proveniente dal rilevatore di vibrazione 6 viene elaborato da un sistema di analisi del segnale 7. Esso fornisce in uscita un comando per determinare l'apertura dello "switch" 8 verso uno dei contenitori di stoccaggio 90 e 91, in modo tale che lo spermatozoo oggetto della misura, in uscita dall'output 23B della linea microfluidica 20, possa essere separato in base alle caratteristiche determinate.

La separazione del campione misto, nell'insieme degli spermatozoi portatori del cromosoma X e del cromosoma Y, avviene attraverso una caratteristica fisica distintiva, per esempio la differenza di massa oppure la densità. Una particella che attraversa il segmento di linea microfluidica funzionalizzato secondo la tecnologia proposta nella presente invenzione, altera le proprietà della vibrazione della linea stessa. In particolare una variazione della massa, anche locale, all'interno del segmento determina una variazione della frequenza di risonanza, oppure della variazione del ritardo di fase tra l'attuazione dell'oscillazione e l'oscillazione stessa. Per maggior chiarezza si consideri di forzare il segmento di linea microfluidica alla sua frequenza di risonanza  $f_0$  e di alterare le caratteristiche dell'oscillazione introducendo una particella di densità diversa rispetto al fluido circolante nella linea. Tale variazione di massa  $\Delta m$  determina una variazione della frequenza di risonanza  $\Delta f$ , e se essa è sufficientemente piccola rispetto alla frequenza di risonanza, si ha che il ritardo di fase tra segnale di attuazione e oscillazione varia di una quantità  $\Delta\phi$  pari a:

$$\Delta\phi = -\alpha \Delta m$$

dove la costante  $\alpha$  è proporzionale alla frequenza di risonanza ed inversamente proporzionale alla massa efficace del segmento di linea sospesa. Tale relazione lineare permette di quantificare la variazione di massa all'interno del segmento misurando il ritardo di fase, forzando il segmento ad oscillare alla frequenza di risonanza.

Per poter separare il campione di spermatozoi misto in base ad una determinata caratteristica fisica, come la differenza di densità esistente tra spermatozoi portatori del

cromosoma X e Y, è necessario calibrare il segmento di linea microfluidica, facendo per esempio fluire al suo interno un campione di particelle calibratrici, la cui dimensione, massa e densità siano note. Sulla base della calibrazione effettuata è poi possibile poter effettuare l'operazione di "sorting" in tempo reale secondo la procedura sopraesposta.

- 5 Come risulta evidente da quanto precede, l'invenzione provvede un dispositivo, ed il relativo processo, che permettono di conseguire, rispetto alle tecnologie esistenti della citofluorimetria a flusso e MEMS, i vantaggi che vengono nel seguito evidenziati.

Rispetto alla tecnologia della citofluorimetria a flusso, il dispositivo, ed il relativo processo, oggetto dell'invenzione presenta dei notevoli miglioramenti: il dispositivo è label-free, non  
 10 necessita di alcun marcatore per la rilevazione della differenza fenotipica tra spermatozoi portatori del cromosoma X e quelli portatori del cromosoma Y; esso è dimensionalmente scalabile e parallelizzabile in termini di configurazione, permettendo un aumento delle performance del numero di campioni sessati nell'unità di tempo; inoltre non consiste di un apparato complesso per la rilevazione delle caratteristiche distintive dello spermatozoo, e la  
 15 qualità del segnale non dipende dalla orientazione della cellula all'atto della rilevazione. Il sistema citofluorimetrico, infatti, è affetto dal problema dell'orientamento della testa degli spermatozoi, rispetto al raggio laser incidente. Per tale ragioni e per ovviare a questo problema sono state sviluppate soluzioni efficaci, che però hanno aumentato di molto la complessità ed il costo dei sistemi.

- 20 Rispetto ai dispositivi MEMS, inoltre, basati su tecnologia cantilever con sistema di circolazione microfluidica integrato, precedentemente citati, il dispositivo proposto nell'invenzione presenta un chiaro segno distintivo di miglioramento tecnico.

1. Principalmente, la configurazione di un segmento di linea microfluidica permette il transito naturale di uno spermatozoo, in sospensione all'interno di un fluido di trasposto. La  
 25 configurazione cantilever necessita invece di un canale microfluidico a forma di U, la cui regione di curvatura sia localizzata intorno all'estremo libero, dove il dispositivo risulta più sensibile alle variazioni delle caratteristiche dell'oscillazione, per campioni discreti. Tale necessità di configurazione geometrica può risultare però un problema tecnologico quando il campione oggetto della misura è uno spermatozoo, il quale, sebbene abbia dimensioni  
 30 variabili a seconda della specie, nel caso specifico degli spermatozoi bovini, consiste approssimativamente di una testa lunga circa 10  $\mu\text{m}$ , larga circa 5  $\mu\text{m}$ , con uno spessore dell'ordine di qualche centinaio di nanometri, e di un flagello di notevoli dimensioni: circa 60

µm. Tale morfologia causerebbe problematiche al transito della cellula nella zona di gomito del microcanale. Sarebbe, dunque, necessario ridurre la curvatura del gomito e conseguentemente incrementare la larghezza del microcantilever, a discapito del fattore di qualità (Q) del sensore. Con l'incremento del rapporto larghezza/lunghezza i microcantilever, operanti soprattutto in aria e nei liquidi, riducono il proprio fattore di qualità e conseguentemente la sensibilità a causa di una serie di effetti dispersivi, quali ad esempio la viscosità del mezzo in cui vibrano, come descritto nell'articolo di Z. Hao et al., Sensors and Actuators A 109 (2003) 156-164. Questo effetto è notevolmente meno pronunciato per sistemi vibranti in cui il rapporto larghezza/lunghezza è molto basso. Nel caso di un micro capillare vibrante, la larghezza dell'elemento risonante può essere ridotta al minimo e consistere quasi esclusivamente della sola sezione della linea di trasporto del fluido. Ciò rende l'invenzione adatta anche per operare in ambienti ordinari, e non soltanto nel vuoto.

2. Una delle problematiche note nella manipolazione delle cellule spermatiche nasce, inoltre, dall'elevata capacità di sticking con le superfici. La circolazione in un canale ad alta curvatura, aumenta notevolmente le probabilità di accumulo delle cellule nel gomito del canale rendendolo in breve inutilizzabile. Un ulteriore problematica nasce dai tempi caratteristici di risposta del sensore. Per ovviare a tale problema sarebbe necessario incrementare notevolmente le pressioni interne della linea, aumentando la velocità di transito sull'area sensibile, a discapito della risoluzione temporale della misura e dell'accuratezza della stessa. La geometria lineare del segmento di linea microfluidica ed il gradiente del campo di velocità, così come già ampiamente testato, permettono l'allineamento della testa dello spermatozoo lungo l'asse maggiore del canale, riducendo al minimo il rischio di sticking delle cellule lungo le superfici interne del segmento sensibile, anche a basse portate. È possibile, dunque, ridurre notevolmente i tempi di attraversamento a vantaggio della risoluzione temporale della misura.

3. Le tecniche di fabbricazione di un dispositivo MEMS, come quello proposto nei riferimenti citati, sono complesse e presentano alcune limitazioni. Le tecniche tipicamente impiegate in microfluidica sono ampiamente meno costose e più facilmente realizzabili. Nel caso specifico, il vantaggio più evidente del dispositivo proposto, nasce dal fatto che le caratteristiche di sensibilità dell'elemento sono demandate alla semplice produzione del capillare microfluidico e nello specifico al dimensionamento delle sezioni interne ed esterne

dello stesso. Una volta prodotto il micro capillare, esso viene applicato meccanicamente al dispositivo attraverso i vincoli opportunamente distanziati, determinando in base alla distanza dei vincoli e alle sezioni interne ed esterne del capillare la sensibilità caratteristica dell'elemento. Secondo le tecnologie preesistenti, invece, è necessario dimensionare e produrre diversi sensori a seconda delle applicazioni e dell'intervallo di sensibilità richiesti, con processi complessi e costosi come quelli microlitografici. Nell'invenzione proposta, una volta realizzato il dispositivo, il problema della fabbricazione si trasferisce dunque, alla sola produzione del microcapillare.

4. Il segmento microfluidico, reso sensibile attraverso il meccanismo descritto, è esso stesso parte della linea del sistema di circolazione, pertanto non presenta discontinuità e non necessita di giunzioni, ramificazioni o strozzature nelle sue vicinanze. Per tale ragione si risolvono i problemi derivanti dalla formazione di microbolle in prossimità dei punti di discontinuità o di variazione delle geometrie.

Sulla base di quanto sopra esposto, si comprende quindi che il dispositivo, ed il relativo processo, oggetto della presente invenzione, raggiungono gli scopi e realizzano i vantaggi menzionati in precedenza.

E' chiaro, infine, che numerose altre varianti possono essere apportate al dispositivo, ed al relativo processo in questione, senza per questo uscire dai principi di novità insiti nell'idea inventiva, così come è chiaro che, nella pratica attuazione dell'invenzione, i materiali, le forme e le dimensioni dei dettagli illustrati potranno essere qualsiasi, a seconda delle esigenze, e potranno essere sostituiti con altri tecnicamente equivalenti.

Ove le caratteristiche costruttive e le tecniche menzionate nelle successive rivendicazioni siano seguite da segni o numeri di riferimento, tali segni o numeri di riferimento sono stati introdotti con il solo obiettivo di aumentare l'intelligibilità delle rivendicazioni stesse e, di conseguenza, essi non presentano alcun effetto limitante sull'interpretazione di ciascun elemento identificato, a titolo puramente di esempio, da tali segni o numeri di riferimento.

-----

## RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo (1) per rendere sensibile un linea capillare microfluidica atta alla rilevazione ed alla caratterizzazione di fluidi comprendente:
  - una linea microfluidica (20);
  - 5    - almeno una coppia di vincoli (26, 28) solidali con una struttura di supporto;
  - un attuatore di vibrazione (22); ed
  - un sistema di rivelazione (60, 61) della vibrazione meccanica,
 caratterizzato dal fatto che detta almeno una coppia di vincoli (26, 28) intercetta e fissa un segmento sospeso (10) di detta linea microfluidica (20), detto attuatore di vibrazione (22)
   
10 induce detto segmento sospeso (10) ad oscillare alla frequenza di risonanza e detto sistema di rivelazione della vibrazione rileva almeno una delle variazioni delle caratteristiche dell'oscillazione causata da almeno una variazione delle proprietà del fluido compreso all'interno di detto segmento sospeso (10), così rendendo direttamente sensibile detto segmento sospeso (10) durante il passaggio di detto fluido.
- 15 2. Dispositivo (1) secondo la rivendicazione 1, in cui detti vincoli (26, 28) che determinano il fissaggio di detto segmento (10) sono scelti tra:
  - microgripping meccanici, elettromeccanici o piezoelettrici;
  - vincoli pneumatici;
  - vincoli magnetici;
  - 20    - vincoli chimici (materiali adesivi).
3. Dispositivo (1) secondo la rivendicazione 1, in cui almeno uno di detti elementi della coppia di vincoli (26, 28) può essere fatto traslare, manualmente o attraverso un dispositivo elettromeccanico, lungo la direzione della linea capillare microfluidica (20), così predisponendo diverse possibili lunghezze e diverse corrispondenti caratteristiche
   
25 vibrazionali di detto segmento sospeso (10).
4. Dispositivo (1) secondo la rivendicazione 1, in cui detto attuatore (22) è scelto tra:
  - almeno un elemento piezoelettrico solidale ai vincoli meccanici (26, 28);
  - un attuatore elettromagnetico;
  - un attuatore elettrostatico;
  - 30    - un attuatore termico;
  - un attuatore ottico;
  - almeno una coppia dei suddetti vincoli (26, 28).

5. Dispositivo (1) secondo la rivendicazione 1, in cui detto sistema di rivelazione della vibrazione meccanica comprende almeno una tra le seguenti alternative:
  - almeno una sorgente laser ed almeno un fotodiodo;
  - almeno un condensatore;
  - 5    - almeno un elemento piezoresistivo integrato con detto segmento sospeso (10);
  - almeno un elemento piezoelettrico integrato con detto segmento sospeso (10).
6. Dispositivo (1) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui si utilizza una pluralità di detti dispositivi (1) disposti in parallelo o in serie.
7. Processo per la rilevazione e la caratterizzazione di fluidi comprendente le fasi di:
  - 10    i. predisporre una linea microfluidica dotata di ingresso ed uscita;
  - ii. predisporre un supporto dotato di almeno due vincoli meccanici;
  - iii. intercettare un segmento sospeso di detta linea microfluidica tra detti due vincoli meccanici, così rendendo direttamente sensibile detto segmento sospeso;
  - iv. predisporre un fluido e farlo fluire attraverso detto segmento sospeso di detta linea microfluidica;
  - 15    v. indurre la vibrazione di detto segmento sospeso, così rilevando e caratterizzando detto fluido.
8. Processo secondo la rivendicazione 7, in cui la caratteristica misurata è una tra:
  - la variazione del ritardo di fase tra attuazione e oscillazione di detto segmento sospeso;
  - 20    - la variazione della frequenza di risonanza di detto segmento sospeso;
  - la flessione statica di detto segmento sospeso senza induzione della vibrazione.
9. Processo secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui il campione è scelto tra:
  - a. un fluido biologico consistente in una popolazione mista di spermatozoi, comprendente spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi portatori del cromosoma Y, in cui la proprietà rivelata è la differenza di massa o di densità tra spermatozoi portatori del cromosoma X e spermatozoi portatori del cromosoma Y;
  - 25    b. fluidi in cui siano presenti in sospensione cellule, batteri, virus, pollini, in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità;
  - 30    c. fluidi in cui siano sospesi o diluiti micro e nano particelle, composti chimici, polveri e fluidi di diversa natura, in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità;

d. gas in cui la proprietà rivelata è la variazione di massa o di densità.

10. Uso per il "sorting" di un campione misto di spermatozoi del dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui si separano gli spermatozoi portatori del cromosoma X da quelli portatori del cromosoma Y mediante il confronto con un valore di soglia stabilito da una procedura di calibrazione che utilizza detto dispositivo.

5

-----



## CLAIMS

1. A device (1) to make sensitive a microfluidic capillary line suitable for the detection and the characterisation of fluids comprising:

- a microfluidic line (20);
- 5 - at least one pair of joining means (26, 28) integral with a support structure;
- a vibration actuator (22); and
- a detection system (60, 61) of the mechanical vibration,

characterised in that said at least one pair of joining means (26, 28) intercepts and fixes a suspended segment (10) of said microfluidic line (20), said vibration actuator (22) induces  
 10 said suspended segment (10) to oscillate at the resonance frequency and said detection system of the mechanical vibration detects at least one of the variations of the characteristics of the oscillation caused by at least a variation of the properties of the fluid included inside said suspended segment (10), thus making directly sensitive said suspended segment (10 ) during the passage of said fluid.

15 2. A device (1) according to claim 1, wherein said joining means (26, 28) determining the fixing of said segment (10) are selected from:

- mechanical, electromechanical or piezoelectric microgrippings;
- pneumatic means;
- magnetic means;
- 20 - chemical means (adhesive materials).

3. A device (1) according to claim 1, wherein at least one of said elements of the pair of joining means (26, 28) can be made to translate, manually or through an electromechanical device, along the direction of the microfluidic capillary line(20), thus providing different possible lengths and several corresponding vibrational characteristics of said suspended  
 25 segment (10).

4. A device (1) according to claim 1, wherein said actuator (22) is selected from:

- at least one piezoelectric element integral with the mechanical joining means (26, 28);
- an electromagnetic actuator;
- an electrostatic actuator;
- 30 - a thermal actuator;
- an optic actuator;
- at least one pair of said joining means (26, 28).

5. A device (1) according to claim 1, wherein said detection system of the mechanical vibration comprises at least one of the following alternatives:

- at least one laser source and at least one photodiode;
- at least one capacitor;
- 5 - at least one piezoresistive element integrated with said suspended segment (10);
- at least one piezoelectric element integrated with suspended segment (10).

6. A device (1) according to any of the claims 1 to 5, wherein a plurality of said devices (1) arranged in parallel or in series is used.

7. A process for the detection and the characterisation of fluids comprising the steps of:

- 10 i. preparing a microfluidic line with an input and an output;
- ii. preparing a support equipped with at least two mechanical joining means;
- iii. intercepting a suspended segment of said microfluidic line between said two mechanical joining means, thus making directly sensitive said suspended segment;
- iv. providing a fluid and making it to flow through said suspended segment of said microfluidic line;
- 15 v. inducing the vibration of said suspended segment, thus detecting and characterising said fluid.

8. A process according to claim 7, wherein the measured characteristic is one of:

- 20 - the change in phase delay between the actuation and the oscillation of said suspended segment;
- the change in the resonance frequency of said suspended segment;
- the static deflection of said segment suspended without inducing vibration.

9. A process according to claim 7 or 8, wherein the sample is selected from:

- 25 a. a biological fluid consisting of a mixed population of sperm cells, comprising X-chromosome bearing spermatozoa and Y-chromosome bearing spermatozoa, in which detected property is the difference in mass or density between X-chromosome bearing spermatozoa and Y-chromosome bearing spermatozoa ;
- b. fluids in which cells, bacteria, viruses, pollens are present in suspension, in which the detected property is the mass or density behavior;
- 30 c. fluids in which micro and nano particles, chemical compounds, powders and fluids of different nature are suspended or diluted, in which the detected property is the mass or density behavior;

d. gases in which the detected property is the mass or density behavior.

10. Use for "sorting" a mixed sample of sperm cells of the device according to any of claims 1 to 6, wherein the X-chromosome bearing spermatozoa are separated from y-chromosome bearing spermatozoa through the comparison with a threshold value
- 5 established by a calibration procedure using said device.

-----

I / IV

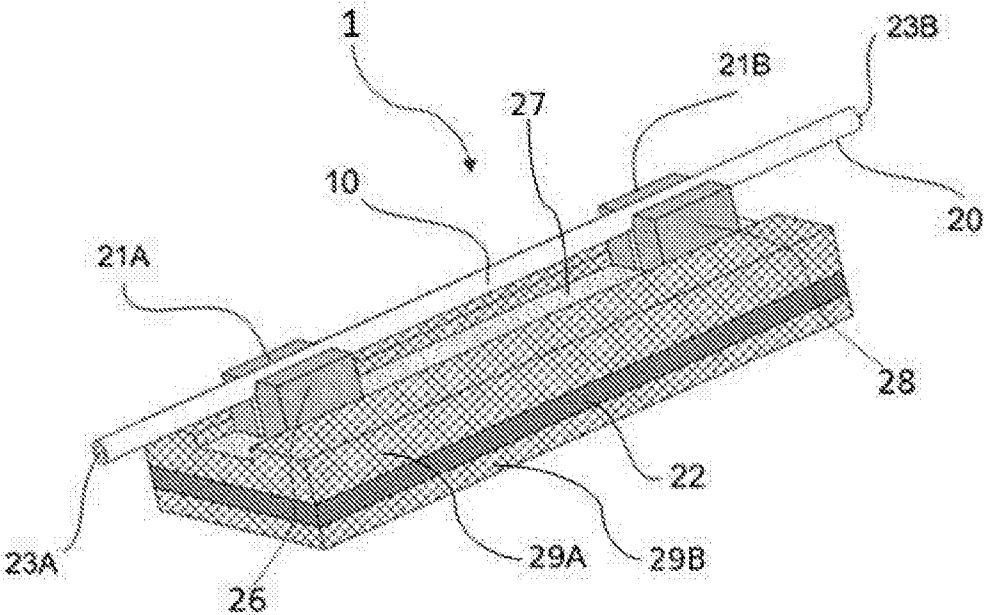


FIG. 1

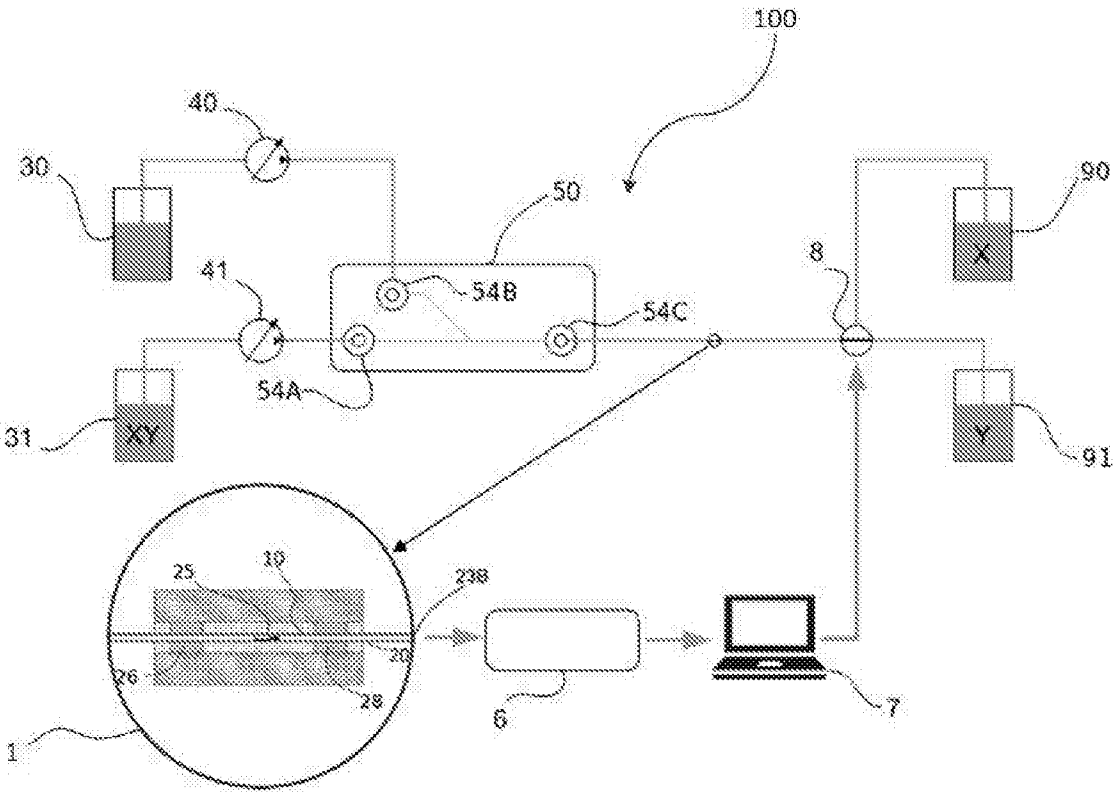


FIG. 7

II / IV

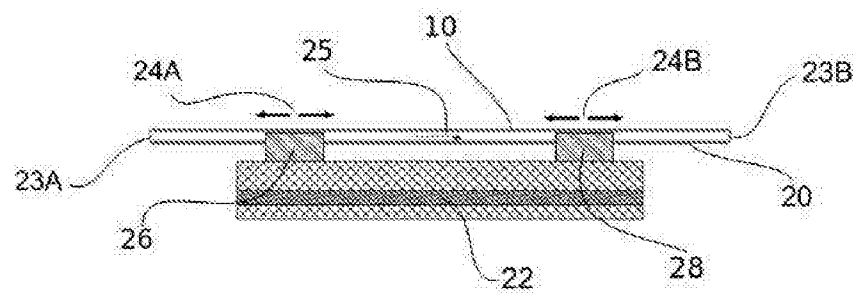


FIG. 2A

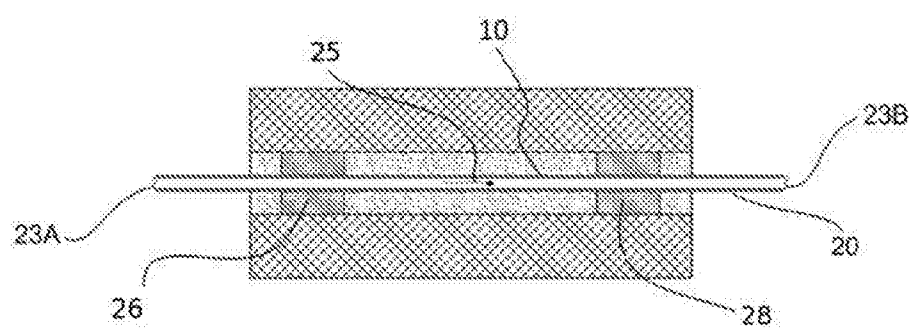


FIG. 2B

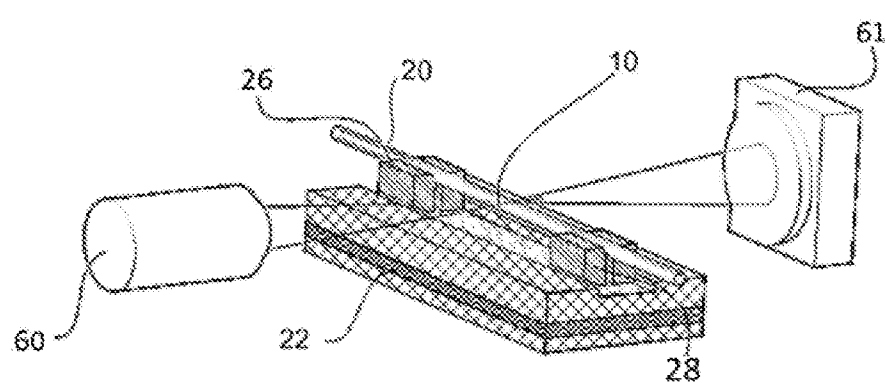


FIG. 3

III / IV

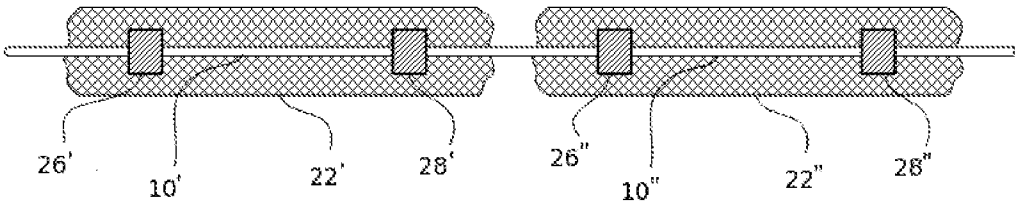


FIG. 4A

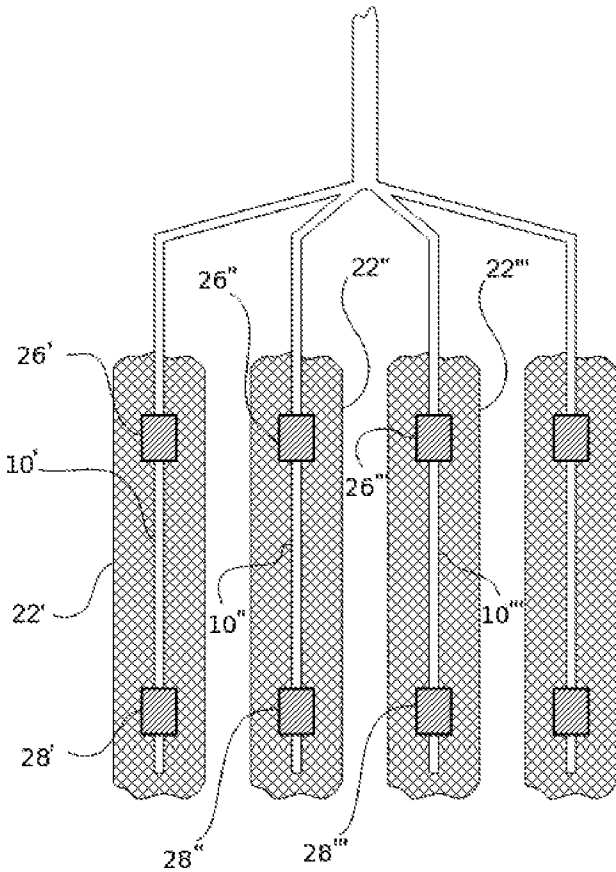


FIG. 4B

IV / IV

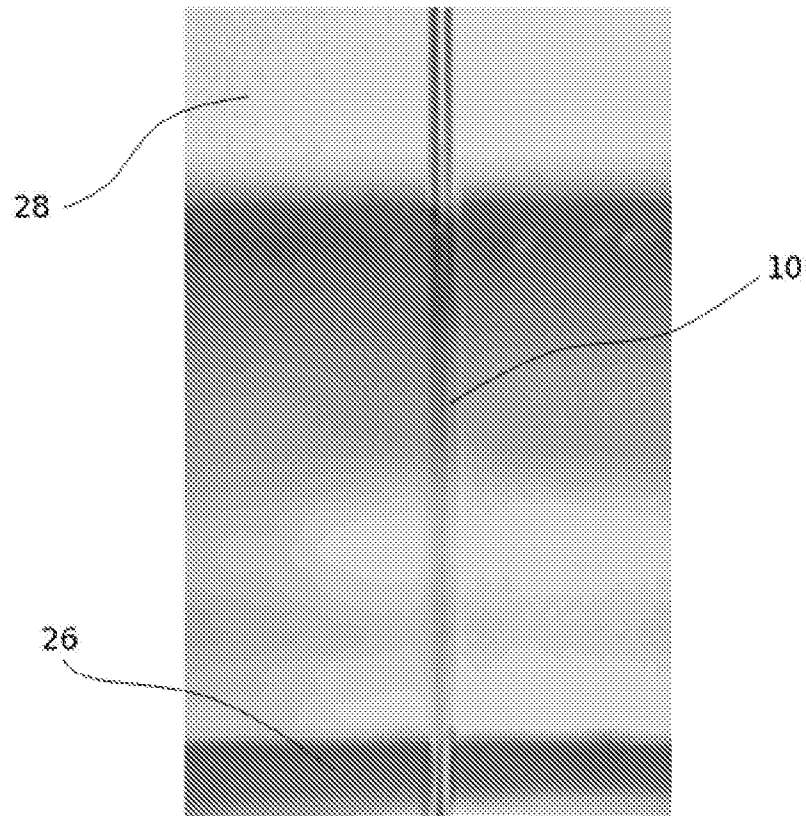


FIG. 5

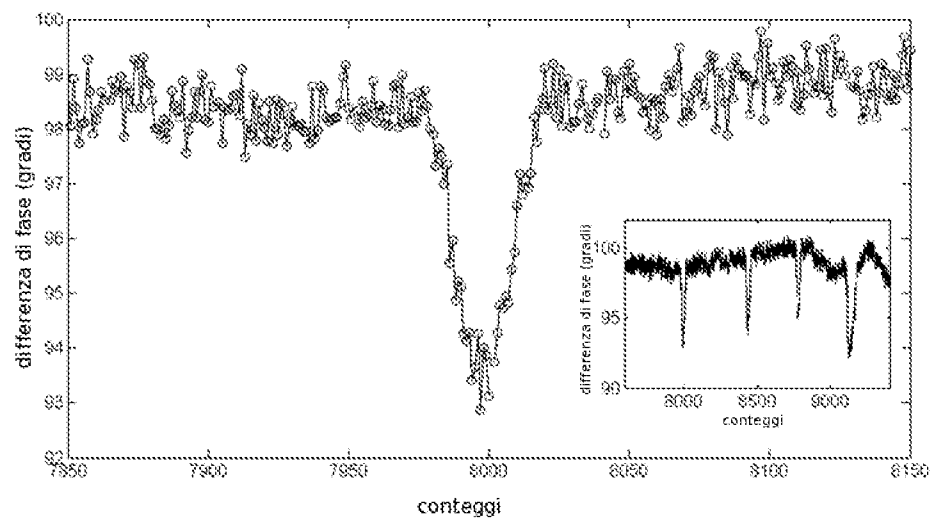


FIG. 6