

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901992079A1

Publication Date

20130428

Applicant

SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Title

METODO ED APPARATO PER L'ANALISI OTTICA DI PARTICELLE A BASSE
TEMPERATURE.

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"METODO ED APPARATO PER L'ANALISI OTTICA DI PARTICELLE A BASSE TEMPERATURE"

"METHOD AND DEVICE FOR OPTICAL ANALYSIS OF PARTICLES AT LOW TEMPERATURES"

di SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

di nazionalità italiana

con sede: VIA DEI LAPIDARI, 12

BOLOGNA (BO)

Inventori: MEDORO Gianni, CALANCA Alex, MANARESI Nicolo'

* * *

Campo della tecnica

La presente invenzione riguarda dei metodi ed apparati per la manipolazione di particelle in sospensione in un fluido, ad esempio contenute in soluzioni conduttive o altamente conduttive, quando è necessario effettuare l'analisi ottica delle particelle manipolate a temperature inferiori a quella ambiente. L'invenzione trova applicazione principalmente nella implementazione di protocolli biologici su cellule vive.

Stato dell'arte

La domanda di brevetto PCT/WO 00/69565 a G. Medoro descrive un apparato e metodo per la manipolazione di particelle tramite l'utilizzo di gabbie di potenziale

dielettroforetico chiuse. La forza utilizzata per mantenere in sospensione le particelle o per muoverle all'interno della microcamera dissipa per effetto Joule una potenza che è proporzionale al quadrato della ampiezza delle tensioni applicate e cresce linearmente all'aumentare della conducibilità elettrica del liquido di sospensione causando un incontrollato aumento di temperatura all'interno della microcamera. Il controllo individuale sulle operazioni di manipolazione può avvenire tramite la programmazione di elementi di memoria e circuiti associati a ciascun elemento di una schiera di elettrodi integrati in uno stesso substrato; tali circuiti contribuiscono all'aumento di temperatura dissipando potenza nel substrato a diretto contatto con il liquido di sospensione. Ne consegue una importante limitazione dovuta alla variazione della espressione genica o ad elevati livelli di stress o alla morte delle particelle di natura biologica presenti nel campione per soluzioni ad alta conducibilità elettrica limitando la applicazione di tale metodi ed apparati all'uso di biglie o cellule non vive.

Le limitazioni dell'arte nota sono superate dalla domanda di brevetto EP1945368 a nome della stessa Richiedente, che consente di manipolare particelle biologiche mediante la tecnica descritta in PCT/WO 00/69565 (o mediante altre tecniche che sviluppano calore)

preservando la vitalità e le funzioni biologiche delle cellule indipendentemente dalle forze utilizzate e/o dalla conducibilità del liquido di sospensione, permettendo pertanto la manipolazione di cellule vive.

Tuttavia, numerose applicazioni richiedono che il liquido di sospensione e/o tutto l'interno della microcamera siano mantenuti durante la procedura di manipolazione a temperature molto al di sotto della temperatura ambiente, ad esempio a temperature inferiori ai 10°C e, più frequentemente, comprese tra 3 e 5°C, ad esempio 4°C.

A temperature così basse si verifica il fenomeno della condensazione di umidità ambiente sulla superficie esterna del coperchio della microcamera, che è realizzato in materiale trasparente, allo scopo di permettere l'osservazione ed analisi ottica delle cellule in sospensione, o mediante apparati o sensori esterni alla microcamera, ad esempio tramite un microscopio ottico, o mediante sensori ottici interni alla microcamera, integrati nel substrato, che necessitano però, per funzionare correttamente, di una illuminazione esterna adeguata.

La presenza di umidità condensata sul coperchio della microcamera provoca sia un offuscamento dell'immagine acquisibile dall'esterno, sia una alterazione del passaggio della luce esterna impedendo di fatto il corretto

svolgimento dei protocolli di analisi, a meno di affidarsi completamente a sensori interni non ottici, ad esempio impedenziometrici, il che non è però sempre possibile o conveniente.

Oggetto dell'invenzione

La presente invenzione riguarda un metodo ed apparato per effettuare l'analisi ottica di particelle contenute in sospensione in un fluido, tipicamente un liquido, disposto all'interno di un dispositivo microfluidico che lo mantiene ad una temperatura sensibilmente inferiore a quella ambiente e tale da poter innescare fenomeni di condensazione sulla superficie esterna del dispositivo microfluidico stesso. Tipicamente, il dispositivo microfluidico serve per effettuare la manipolazione e/o il controllo della posizione delle particelle, ad esempio mediante campi di forza di natura elettrica in soluzioni elettricamente conduttive, e più in generale mediante qualsiasi altro sistema, in condizione che richiedano contemporaneamente una relativamente bassa temperatura di esercizio e l'esecuzione di una analisi ottica della posizione e/o aspetto delle particelle manipolate, ovvero per il rilevamento di parametri morfologici o per la quantificazione di intensità di fluorescenza. I campi di forza possono essere di dielettroforesi (positiva o negativa), magnetoforesi, elettroforesi, elettroidro-

dinamici o elettrowetting su dielettrico, o combinazioni di questi fenomeni, caratterizzati da un insieme di punti di equilibrio stabile per le particelle. Anche l'uso di optical tweezers è contemplato.

L'aspetto principale del trovato riguarda l'effettuazione della prevenzione della condensazione di umidità sulla superficie esterna del coperchio di un dispositivo microfluidico operante con una relativamente bassa temperatura interna o mediante l'aumento della temperatura della superficie esterna del coperchio al di sopra della temperatura di condensazione (punto di rugiada, indicato di seguito anche come punto di Dew), o mediante l'abbassamento della temperatura e/o della umidità ambiente in prossimità del coperchio del dispositivo microfluidico, in modo da portare la temperatura di condensazione (punto di Dew) al di sotto della temperatura di funzionamento interna del dispositivo microfluidico.

A tale proposito il sistema può beneficiare dell'uso di uno o più sensori integrati o esterni per il controllo della temperatura ed, eventualmente, della umidità ambiente e della temperatura della superficie esterna del coperchio mediante un controllo in retroazione.

L'invenzione permette inoltre di implementare l'utilizzo di sistemi ottici esterni del tipo a trasmissione.

Breve descrizione delle figure

Figure 1A ed 1B illustano schematicamente in sezione longitudinale due diverse forme di realizzazione di un dispositivo microfluidico che attua una prima forma di realizzazione del metodo dell'invenzione;

Figura 2 illustra schematicamente una vista in pianta dall'alto di una forma di attuazione del dispositivo microfluidico di figura 1;

Figura 3 illustra schematicamente in scala ingrandita una sezione verticale del dispositivo microfluidico di figura 2;

Figura 4 è un diagramma che mostra la variazione del punto di Dew in funzione della umidità e temperatura dell'aria;

Figura 5 illustra schematicamente in sezione longitudinale un dispositivo microfluidico che attua una seconda forma di realizzazione del metodo dell'invenzione;
e

Figure 6 e 7 sono diagrammi che mostrano la variazione della temperatura della superficie superiore del dispositivo microfluidico di figura 2 in base alla variazione di alcuni parametri di funzionamento.

Descrizione dettagliata

Nel seguito si userà il termine particelle per indicare entità micrometriche o nanometriche, naturali o

artificiali, quali cellule, componenti subcellulari, virus, liposomi, niosomi, microbiglie e nanobiglie, o anche entità più piccole quali macro-molecole, proteine, DNA, RNA, ecc, così come gocce di liquido immiscibile nel mezzo di sospensione, ad esempio olio in acqua, o acqua in olio, o anche gocce di liquido in gas (quali acqua in aria) o bollicine di gas in liquido (quali aria in acqua).

La presente invenzione ha come scopo la realizzazione di un metodo ed un apparato per l'analisi ottica di particelle a temperature inferiori a quella ambiente ed, in particolare, a temperature relativamente basse (3-6°C), le particelle essendo mantenute in sospensione in un fluido, tipicamente un liquido, disposto all'interno di un dispositivo microfluidico, che permette anche la manipolazione delle particelle stesse.

Per manipolazione si intende il controllo della posizione di particelle singole o di gruppi di particelle o lo spostamento nello spazio di tali particelle o gruppi di particelle.

Tale manipolazione può essere effettuata con qualsiasi mezzo integrato nell'apparato secondo il trovato o interagente con lo stesso dall'esterno. Tipicamente la manipolazione si effettua tramite una schiera di elettrodi selettivamente attivabili ed indirizzabili integrati in un substrato ed affacciati ad un unico contro-elettrodo che

serve anche da coperchio della microcamera, secondo quanto descritto in PCT/WO 00/69565, il cui contenuto viene qui incorporato per le parti necessarie.

Con riferimento alle figure 1A,B e 2, è indicato in esse con 1a, rispettivamente 1b, un apparato per effettuare l'analisi ottica di particelle 2 contenute in sospensione in un fluido 3, tipicamente un liquido, capace di operare mantenendo le particelle 2 ed il liquido 3 a temperature inferiori a quella ambiente e, in particolare, vicine a zero gradi centigradi, tipicamente temperature comprese tra 3 e 6°C e preferibilmente ad una temperatura di circa 4°C.

L'apparato 1a,1b comprende, secondo gli schemi di massima illustrati in figura 1A ed 1B, dove i dettagli simili od uguali sono indicati per semplicità con i medesimi numeri di riferimento, almeno una microcamera 4 contenente in uso il fluido 3 e delimitata tra una prima superficie 5 ed una seconda superficie 6; e mezzi di raffreddamento, indicati nel complesso con 7, termicamente accoppiati con la superficie 5 tramite una prima resistenza termica RLW.

Con il termine "microcamera" si deve intendere qui e nel seguito una camera adatta a contenere un piccolo volume di fluido 3, tipicamente compreso tra 1 nanolitro e 5000 microlitri, e preferibilmente compreso tra 1 microlitro e 100 microlitri e che presenta una delle sue tre dimensioni

inferiore ad 1 mm.

L'apparato 1 comprende inoltre una superficie 8 di ispezione ottica termicamente accoppiata con la superficie 6 attraverso una seconda resistenza termica RHI.

I mezzi di raffreddamento 7 possono essere di qualsiasi tipo conveniente atto a sottrarre calore dalla microcamera 4 in quantità tale da mantenere il fluido 3 ad una prima temperatura prefissata T_1 , inferiore alla temperatura ambiente, come già indicato tipicamente 4°C .

Nell'esempio illustrato in figura 1B, i mezzi di raffreddamento 7 consistono in una piastra 10 disposta a contatto con la resistenza termica RLW e nella quale sono integrate una o più celle ad effetto Peltier 11 (una sola delle quali è rappresentata solo in modo schematico, in quanto di per sé nota) controllate da un dispositivo di controllo 12 della temperatura interna della camera 4, solo schematicamente rappresentato con un blocco.

Nell'esempio illustrato in figura 1A, invece, i mezzi di raffreddamento 7 consistono in una seconda microcamera 10c, nella quale scorre, a contatto con la resistenza termica RLW un flusso di fluido refrigerante 11c, indicato con una freccia in figura 1A, che viene fatto circolare in circuito chiuso e da cui viene continuamente eliminato il calore asportato dalla microcamera 4 attraverso la superficie 5 mediante una pompa 12c accoppiata ad una cella

ad effetto Peltier, 13c, indicate schematicamente con un blocco.

Con riferimento anche alle figure 2 e 3, la resistenza termica RLW è costituita da una lastra 14 piana, ad esempio una lastra di quarzo, eventualmente trasparente, una prima faccia, superiore, della quale è costituita dalla superficie 5 ed una seconda faccia della quale, inferiore, è costituita da una superficie 15 disposta a contatto con la piastra 10; la resistenza termica RHI è pure costituita da una lastra piana 16, necessariamente realizzata in un materiale trasparente, ad esempio consistente in una lastra in vetro minerale o quarzo, una prima faccia della quale, rivolta da banda opposta alla microcamera 4, costituisce la superficie 8 di ispezione ottica, ed una seconda faccia della quale, opposta alla prima faccia, costituisce la superficie 6.

Le due lastre 14,16 sono disposte affacciate e sono separate tra loro da uno spaziatore perimetrale 18 (indicato schematicamente solo con una linea in figura 1), che delimita insieme alle lastre 14,16 il volume interno della microcamera 4. Questa ultima, ovvero tutto il complesso costituito dalle lastre 14,16 e dallo spaziatore 18, è appoggiato su un basamento 19 (figura 3).

Nel caso in cui si utilizzino per manipolare le particelle 2 gabbie di potenziale di dielettroforesi, come

descritto in WO 00/69565, la superficie 5 costituisce il substrato che supporta la matrice di microelettrodi, mentre la superficie 6 risulta interamente rivestita da uno strato ITO che costituisce il contro-elettrodo. Nel substrato, oltre ai microelettrodi, possono essere integrati uno o più sensori ottici, che rivelano eventuali alterazioni (dovute ad esempio alla presenza di una particella 2) della luce ambiente che penetra nella microcamera 4 attraverso la superficie 8. In alternativa o in aggiunta, possono essere previsti sensori ottici esterni alla microcamera 4, ad esempio costituiti da un semplice microscopio 21 di qualsiasi tipo, indicato schematicamente con un blocco in figura 1A e 1B, che osserva/no l'interno della microcamera 4 attraverso la superficie 8. Il microscopio 21 può individuare immagini e ricevere luce eventualmente riflessa dal substrato costituito dalla superficie 5 ad esempio secondo le traiettorie indicate dalle frecce in figura 1A, 1B.

Secondo un primo aspetto del trovato, la seconda resistenza termica RHI presenta un valore di conducibilità termica di almeno un ordine di grandezza e, preferibilmente, di due ordini di grandezza, inferiore a quello della prima resistenza termica RLW; ad esempio, con i materiali prima indicati, la lastra 14 presenta una conducibilità di circa $150 \text{ W/}^\circ\text{K}\cdot\text{m}$ mentre la lastra 16

presenta una conducibilità termica di soli $1,2 \text{ W/}^\circ\text{K}\cdot\text{m}$ circa.

In combinazione con questa caratteristica, l'apparato 1 comprende inoltre, secondo il trovato, mezzi 24, indicati schematicamente con un blocco in figura 1, per stabilire in corrispondenza della superficie 8 di ispezione ottica un flusso termico F (indicato schematicamente con una doppia freccia in figura 1) tale per cui la superficie 8 è costantemente mantenuta ad una temperatura T_2 , maggiore della temperatura T_d di condensazione dell'umidità ambientale (punto di Dew o punto di rugiada) contenuta nell'aria che lambisce in uso la superficie di ispezione ottica 8 stessa.

La temperatura T_d , come illustra il diagramma di figura 4, può essere facilmente calcolata in funzione della temperatura dell'aria ambiente e della quantità di umidità presente nell'aria ambiente. Per valori medi, presenti di solito in un laboratorio (23°C e 50% di umidità) la temperatura T_d è di circa 12°C . È evidente che essendo la temperatura T_1 nella microcamera 4 di circa 4°C , la temperatura della superficie 8 raggiungerebbe inevitabilmente in uso, per conduzione, una temperatura inferiore a T_d , producendo l'offuscamento della superficie 8.

Questo fenomeno viene evitato secondo il trovato

grazie alla combinazione di una opportuna scelta del rapporto tra le conducibilità termiche delle resistenze termiche RLW e RHI e la presenza contemporanea dei mezzi 20. Questa combinazione infatti, permette sorprendentemente, da una parte, di mantenere, come si vedrà, una temperatura T_2 della superficie 8 sempre maggiore della temperatura T_d dell'aria che lambisce in uso la superficie 8 stessa, in modo da evitare e/o eliminare l'offuscamento della superficie 8 quando la temperatura T_1 all'interno della microcamera 4 è molto bassa. E, dall'altra parte, di evitare o, quanto meno contenere, un eventuale riscaldamento del fluido 3. Si è infatti sperimentalmente dimostrato che anche qualora un flusso termico "caldo" raggiunga la microcamera 4, l'eventuale innalzamento della temperatura T_1 può essere facilmente evitato semplicemente abbassando la temperatura imposta dalla centralina 12 sulla cella ad effetto Peltier 11 senza innescare moti convettivi, che sarebbero del tutto indesiderati, all'interno della microcamera 4.

Secondo una prima forma possibile di realizzazione del trovato, l'apparato 1b (o 1a) comprende mezzi 24b (figure 2,3) per riscaldare la superficie 8 di ispezione ottica sopra al punto di Dew dell'aria ambiente, ovvero sopra la temperatura T_d .

Tali mezzi 24b consistono in un resistore direttamente

applicato integrale di pezzo sulla superficie 8 della lastra 16. Secondo un esempio di attuazione illustrato solo schematicamente e solo in parte in figura 1, il resistore 24b è costituito da uno strato 25 conduttivo resistivo trasparente, ad esempio ITO , steso uniformemente su tutta la superficie 8 di ispezione ottica.

In una seconda possibile forma di attuazione del trovato, il resistore 24b è costituito da almeno uno, e preferibilmente da una pluralità di micro resistori filiformi, o fili, 26 applicati integrali di pezzo alla superficie 8 di ispezione ottica, preferibilmente disposti a pettine ed uniformemente spaziati tra loro.

I micro resistori filiformi 26 sono elettricamente connessi, tutti dalla parte di una medesima loro estremità, con un telaio 27 di distribuzione della corrente elettrica di alimentazione, costituito da una lamina metallica sagomata a pettine, ma disposta in modo opposto ai micro resistori filiformi 26; in altre parole, rispettivi "denti" 28 della lamina metallica sagomata a pettine 27 sono rivolti da banda opposta ai fili 26 e si estendono fuori dalla superficie 8, essendo disposti in corrispondenza di un bordo 29 dell'apparato 1 esterno all'area operativa costituita dalla microcamera 4.

Il telaio 27 riceve la corrente elettrica di alimentazione proprio attraverso i "denti" 28, tramite una

pluralità di ponti conduttori 30 che collegano una pluralità di punti diversi del telaio 27, costituiti dai "denti" 28 appunto, ad almeno un collettore 31 comune disposto in corrispondenza dell'elemento di base 19 dell'apparato 1.

I ponti conduttori 30 sono costituiti da fili metallici deformabili ripiegati a formare dei telai o forcelle sagomati ad S nel piano della figura 3. Anche l'alimentazione elettrica degli elettrodi e degli eventuali sensori ottici presenti nel substrato eventualmente presente sulla superficie 5 viene effettuata con ponti 30, utilizzando altri collettori 32,33.

Per permettere all'apparato 1b (1a) di funzionare correttamente, cioè mantenere la temperatura T_2 al di sopra della temperatura T_d dell'aria che lambisce in uso la superficie 8 senza disperdere eccessivo calore verso la microcamera 4, mantenere la temperatura di tutta la superficie 8 la più uniforme possibile e non interferire con i sensori ottici integrati e/o con i sensori esterni, come il microscopio 21, i micro resistori filiformi 26 devono presentare nella direzione trasversale alla loro direzione di estensione longitudinale una larghezza L (figura 3) pari a circa un decimo del passo P (ovvero della spaziatura) tra gli stessi. In altre parole, il rapporto L/P deve essere preferibilmente pari a $1/10$ e in ogni caso

compreso tra 1/2 e 1/100

Per migliorare le prestazioni dell'apparato 1b (1a), questo comprende preferibilmente anche mezzi 35 (figura 2) per misurare in uso con continuità la temperatura T2 della superficie 8 e mezzi 36 per azionare in retroazione i mezzi 24b per riscaldare la superficie di ispezione ottica; ad esempio i mezzi 35 di rilevazione della temperatura possono essere costituiti da una resistenza elettrica applicata sulla superficie 8, che varia la propria resistività in funzione della temperatura T2, oppure da un sensore ottico disposto affacciato alla superficie 8; nel primo caso, come resistenza elettrica si può utilizzare uno dei micro resistori filiformi 26, effettuando gli opportuni collegamenti elettrici. I mezzi 36 sono costituiti dal microprocessore che controlla tutte le funzioni dell'apparato 1b (1a) o da un microprocessore dedicato ed interagiscono ad esempio con un alimentatore 37 (figura 3) che controlla la corrente fornita al telaio 27 attraverso i ponti 30. Questi ultimi devono essere in numero elevato, in modo che l'intervallo di spaziatura tra uno e l'altro renda sostanzialmente uniforme la temperatura sul lato opposto della lastra 16.

Rispettando i parametri indicati, l'andamento del gradiente di temperatura attraverso lo spessore della lastra 16 per differenti livelli di potenza elettrica

alimentata ai fili o "dita" 26 è quello mostrato in figura 6, che rappresenta la situazione peggiore, ovvero a metà del passo P, cioè della zona di superficie 8 priva di resistori e compresa tra due micro resistori filiformi o "dita" 26, ed in figura 7, che rappresenta invece la situazione migliore, presente direttamente sotto un micro resistore o "dito" 26. Il gradiente di temperatura che si riesce a mantenere attraverso la lastra 16, tenendo conto delle dispersioni termiche verso l'esterno permette a tutta evidenza di mantenere sulla superficie 6 una temperatura molto prossima a T₁, pur avendo sulla superficie 8 una temperatura T₂ uniformemente maggiore della temperatura T_d.

A questo scopo, e indipendentemente dalla forma di realizzazione dei mezzi riscaldanti 24b, è anche opportuno che lo spessore della lastra 16 venga determinato in fase di progetto utilizzando la seguente formula:

$$H_{lid} > \left(\frac{T_{dp} - T_0 - \Delta T_{max}}{\Delta T_{max}} \right) \left(\frac{\sigma_{lid}}{\sigma_{buf}} \right) H_C \quad (1)$$

$$\Delta T_{max} = (T_{buf} - T_0)_{max} \quad (2)$$

dove H_{lid} e H_C sono rispettivamente lo spessore della lastra 16 costituente il coperchio della microcamera 4 e lo spessore della microcamera 4 stessa, T_{dp} è la temperatura del punto di Dew dell'aria ambiente, T₀ è la temperatura operativa teorica desiderata all'interno della microcamera 4, T_{buf} coincide con la temperatura T₁, cioè è la temperatura del liquido 3, ΔT_{max} è il massimo aumento di

temperatura tollerabile all'interno della microcamera 4 rispetto alla temperatura operativa teorica T_0 , σ_{lid} e σ_{buf} sono, rispettivamente, le conducibilità termiche del materiale della lastra 16 e del liquido (buffer) 3.

Con riferimento alla figura 5, dove i dettagli simili od uguali a quelli già descritti sono indicati con i medesimi numeri, l'apparato 1b comprende mezzi riscaldanti 24c esterni alla lastra 16 e costituiti nell'esempio illustrato da un ventilatore 40 e da una resistenza 41 che, controllati dalla centralina 36 collegata ad un sensore 35 della temperatura T_2 della superficie 8 scaldano quest'ultima inviando sulla stessa un flusso di aria ambiente .

In base a quanto descritto, l'invenzione riguarda pertanto anche un metodo per effettuare l'analisi ottica di particelle 2 contenute in sospensione in un fluido 3, a temperature inferiori a quella ambiente, comprendente i passi di:

- i.- disporre le particelle 2 in sospensione all'interno di almeno una microcamera 4 contenente il fluido 3 in uno spazio delimitato tra le superfici 5 e 6;
- ii.- accoppiare termicamente la superficie 5, attraverso la resistenza termica RLW con i mezzi di raffreddamento 7 atti a sottrarre calore dal fluido 3 ed accoppiare termicamente la superficie 6, attraverso la resistenza termica RHI , con

la superficie 8 di ispezione ottica da mantenere tersa;

iii.- portare il fluido 3 alla temperatura T_1 , inferiore a quella ambiente, mediante i mezzi di raffreddamento 7; e

iv.- stabilire in corrispondenza della superficie 8 di ispezione ottica un flusso F termico tale per cui la superficie di ispezione ottica 8 è costantemente mantenuta alla temperatura T_2 , maggiore della temperatura T_d di condensazione dell'umidità ambientale (punto di Dew) contenuta nell'aria che lambisce la superficie di ispezione ottica;

v.- laddove le resistenze termiche RHI e RLW sono scelte in modo che la resistenza termica RHI presenta un valore di conducibilità termica, preferibilmente almeno un ordine di grandezza inferiore a quello della prima resistenza termica RLW e, in ogni caso pari ad almeno la metà della conducibilità termica della resistenza termica RLW prima resistenza termica RHI.

Tipicamente, il flusso termico F è in flusso termico in ingresso, nel senso che il passo (iv) viene effettuato riscaldando la superficie 8 di ispezione ottica sopra al punto di Dew dell'aria ambiente, come precedentemente illustrato.

Il riscaldamento della superficie 8 può essere ottenuto, preferibilmente, per effetto joule, predisponendo sulla stessa, esternamente alla microcamera 4, un resistore

24b scelto nel gruppo consistente in: uno strato conduttivo resistivo trasparente, ad esempio di *Indium Tin Oxide* (ITO, o a base di nano tubi di carbonio, o polimeri conduttivi come il poli(3,4-etilendiossitiiofene) (PEDOT)) 25 steso uniformemente su tutta la superficie 8 di ispezione ottica; una pluralità di micro resistori filiformi 26 stesi sulla superficie di ispezione ottica 8, disposti a pettine, uniformemente spaziati tra loro trasversalmente alla direzione di estensione longitudinale della microcamera 4.

I micro resistori filiformi 26, che secondo una forma di attuazione non illustrata per semplicità possono anche venire disposti secondo una griglia, ovvero in modo da incrociarsi tra di loro, vengono in ogni caso alimentati in modo che la distribuzione di densità di corrente sia omogenea, nella fattispecie illustrata utilizzando il telaio 27 di distribuzione della corrente disposto longitudinalmente in modo ortogonale ai micro resistori filiformi 26, che riceve a sua volta la corrente tramite una pluralità di ponti conduttori 30 che collegano una pluralità di punti diversi 28 del telaio 27 di distribuzione, disposti da banda opposta ai micro resistori 26 filiformi, ad almeno un collettore comune 31.

In alternativa, come si è visto, la superficie di ispezione ottica 8 viene mantenuta ad una temperatura superiore al punto di rugiada facendo fluire sulla stessa

un flusso d'aria mediante convezione forzata, generata ad esempio da un ventilatore 40. Detto flusso, contrasta l'abbassamento della temperatura della superficie di ispezione ottica 8 dovuto all'assorbimento di calore da parte del sistema di raffreddamento attraverso il liquido nella microcamera 4, come illustrato in figura 5.

In ogni caso, il riscaldamento della superficie di ispezione ottica 8 viene preferibilmente controllato in retroazione misurando continuamente, preferibilmente mediante una resistenza 35 applicata sulla superficie 8 di ispezione ottica o mediante un sensore infrarosso disposto affacciato alla superficie di ispezione ottica 8, la temperatura attuale T_2 della stessa.

Secondo una forma di realizzazione differente del trovato, tuttavia, il passo (iv) può venire effettuato con pari efficacia raffreddando una quantità di aria ambiente immediatamente circostante la superficie 8 di ispezione ottica e che lambisce la stessa ad una temperatura T_3 tale che il punto di rugiada di tale quantità di aria diventa inferiore alla temperatura T_2 a cui si trova la superficie di ispezione ottica 8 per effetto della trasmissione termica per conduzione da e verso la microcamera 4 attraverso lo spessore della lastra 16.

Una tale soluzione può essere implementata da un apparato 1b (o 1a) simile a quello illustrato

schematicamente in figura 5, dove si utilizza un ventilatore 40 per ricircolare una medesima quantità di aria presente in prossimità della superficie 8 attraverso un elemento raffreddante 41, ad esempio costituito da un banco di celle ad effetto Peltier disposte tutto attorno alla lastra 16.

La temperatura T_d , soprattutto nelle implementazioni precedentemente descritte, può essere fissata a priori, come stima fissa assumendo il valore di 12°C , che è quello che si verifica nella maggior parte dei casi. Viceversa, si calcola la temperatura T_d effettiva dell'aria ambiente e dell'aria raffreddata che lambisce la superficie 8 per effetto dell'azione del ventilatore 40, ad esempio rilevando sia la temperatura ed umidità ambiente, sia quelle di tale aria raffreddata, mediante opportuni sensori 42 connessi con la centralina 36.

Ovviamente, il raffreddamento causato dalla batteria di celle ad effetto Peltier che stabilisce l'instaurarsi del richiesto flusso termico F secondo il trovato può essere usato per abbassare sia la temperatura che l'umidità dell'aria ambiente, oppure solo la temperatura o solo l'umidità.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per effettuare l'analisi ottica di particelle (2) contenute in sospensione in un fluido, a temperature inferiori alla temperatura di rugiada, comprendente i passi di:

i. disporre le particelle in sospensione all'interno di almeno una microcamera (4) contenente detto fluido e delimitata tra una prima ed una seconda superficie (5,6);

ii. accoppiare termicamente la prima superficie (5), attraverso una prima resistenza termica (RLW), con primi mezzi di raffreddamento (7) atti a sottrarre calore dal fluido ed accoppiare termicamente la seconda superficie (6), attraverso una seconda resistenza termica (RHI), con una superficie di ispezione ottica (8);

iii. portare detto fluido ad una prima temperatura (T_1), inferiore a quella di rugiada, mediante detti primi mezzi di raffreddamento;

iv. stabilire in corrispondenza della superficie di ispezione ottica (8) un flusso termico (F) tale per cui la superficie di ispezione ottica è costantemente mantenuta ad una seconda temperatura (T_2), maggiore della temperatura (T_d) di rugiada dell'umidità ambientale (punto di Dew) contenuta nell'aria che lambisce la superficie di ispezione ottica (8); dette prima e seconda resistenza termica venendo scelte in modo che la seconda resistenza termica

(RHI) presenta un valore di conducibilità termica di, preferibilmente, almeno un ordine di grandezza inferiore a quello della prima resistenza termica (RLW) e, in ogni caso pari ad almeno la metà della conducibilità termica della prima resistenza termica (RLW).

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il passo (iv) viene effettuato riscaldando la superficie di ispezione ottica (8) sopra al punto di rugiada dell'aria ambiente.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che la superficie di ispezione ottica viene riscaldata per effetto joule, predisponendo sulla stessa, esternamente alla microcamera (4), un resistore (24b) scelto nel gruppo consistente in: uno strato (25) conduttivo resistivo trasparente, ad esempio ITO , steso uniformemente su tutta la superficie di ispezione ottica; una pluralità di micro resistori filiformi (26) stesi sulla superficie di ispezione ottica, preferibilmente disposti a pettine, uniformemente spaziati tra loro.

4. Metodo secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che detti micro resistori filiformi (26) vengono alimentati in modo che la distribuzione di densità di corrente sia omogenea utilizzando un telaio di distribuzione (27) della corrente

disposto in modo opposto ai micro resistori filiformi, che riceve a sua volta la corrente tramite una pluralità di ponti conduttori (30) che collegano una pluralità di punti diversi (28) del telaio di distribuzione, disposti da banda opposta ai micro resistori filiformi, ad almeno un collettore comune (31).

5. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che la superficie di ispezione ottica (8) viene riscaldata facendo fluire sulla stessa un flusso d'aria forzato.

6. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il passo (iv) viene effettuato raffreddando una quantità di aria ambiente immediatamente circostante la superficie di ispezione ottica (8) e che lambisce la stessa ad una temperatura tale che il punto di Dew (T_d) di detta quantità di aria è inferiore alla detta seconda temperatura (T_2) a cui si trova la superficie di ispezione ottica.

7. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 2 a 6, caratterizzato dal fatto che la temperatura della superficie di ispezione ottica viene controllata in retroazione misurando continuamente, preferibilmente mediante una resistenza (35) applicata sulla detta superficie di ispezione ottica o mediante un sensore infrarosso disposto affacciato alla superficie di ispezione

ottica, la temperatura attuale (T_2) della superficie di ispezione ottica.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la temperatura (T_2) a cui mantenere la superficie di ispezione ottica viene calcolata in funzione dei parametri di temperatura ed umidità dell'aria ambiente, i quali sono rilevati in continuo mediante opportuni sensori.

9. Apparato (1a,1b) per effettuare l'analisi ottica di particelle (2) contenute in sospensione in un fluido (3), a temperature inferiori a quella di rugiada, comprendente:

- almeno una microcamera (4) contenente detto fluido e delimitata tra una prima (5) ed una seconda (6) superficie;

- primi mezzi di raffreddamento (7) termicamente accoppiati con la prima superficie tramite una prima resistenza termica (RLW), atti a sottrarre calore dalla microcamera in quantità tale da mantenere detto fluido ad una prima temperatura prefissata (T_1), inferiore alla temperatura di rugiada; e

- una superficie di ispezione ottica (8) termicamente accoppiata con la seconda superficie attraverso una seconda resistenza termica (RHI); **caratterizzato dal fatto** che, in combinazione:

- la seconda resistenza termica (RHI) presenta un

valore di conducibilità termica di, preferibilmente, almeno un ordine di grandezza e, ancora più preferibilmente, di due ordini di grandezza, inferiore a quello della prima resistenza termica (RLW) e, in ogni caso, pari ad almeno la metà della conducibilità termica della prima resistenza termica (RLW); e

- l'apparato comprende inoltre mezzi (24) per stabilire in corrispondenza della superficie di ispezione ottica (8) un flusso termico (F) tale per cui la superficie di ispezione ottica è costantemente mantenuta ad una seconda temperatura (T2), maggiore della temperatura di rugiada (Td) a cui si verifica la condensazione dell'umidità ambientale contenuta nell'aria che lambisce in uso la superficie di ispezione ottica (8).

10. Apparato secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che comprende mezzi (24b;24c) per riscaldare la superficie di ispezione ottica (8) sopra alla temperatura di rugiada (Td) dell'aria ambiente.

11. Apparato secondo la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che detti mezzi per riscaldare la superficie di ispezione ottica consistono in un resistore (24b) costituito da: uno strato conduttivo resistivo trasparente, ad esempio ITO (25), steso uniformemente su tutta la superficie di ispezione ottica; o da una pluralità di micro resistori filiformi (26) applicati integrali di

pezzo alla superficie di ispezione ottica (8) e stesi sulla stessa preferibilmente disposti a pettine, uniformemente spaziati tra loro.

12. Apparato secondo la rivendicazione 11, caratterizzato dal fatto che detti micro resistori filiformi (26) sono elettricamente connessi, tutti dalla parte di una medesima loro estremità, con un telaio di distribuzione (27) della corrente costituito da una lamina metallica che riceve la corrente elettrica tramite una pluralità di ponti conduttori (30) che collegano una pluralità di punti diversi (28) del telaio di distribuzione, disposti da banda opposta ai micro resistori filiformi, ad almeno un collettore comune (31) disposto in corrispondenza di un elemento di base (19) dell'apparato che supporta la microcamera; detti micro resistori filiformi (26) presentando in una direzione trasversale alla loro estensione longitudinale una larghezza pari a circa un decimo del passo tra gli stessi.

13. Apparato secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detti mezzi (24) per stabilire in corrispondenza della superficie di ispezione ottica (8) detto flusso termico (F) comprendono mezzi di ventilazione forzata (40) della superficie di ispezione ottica (8) e, preferibilmente, mezzi (41) di riscaldamento o di raffreddamento del flusso di ventilazione forzata.

14. Apparato secondo una delle rivendicazioni da 9 a 13, caratterizzato dal fatto che comprende mezzi (35) per misurare la detta seconda temperatura (T_2) e mezzi (36;37) per azionare in retroazione detti mezzi (24) per stabilire in corrispondenza della superficie di ispezione ottica (8) detto flusso termico (F); e, preferibilmente, mezzi per calcolare la temperatura di rugiada (T_d) dell'aria ambiente.

p.i.: SILICON BIOSYSTEMS S.P.A.

Rinaldo PLEBANI

TITLE: METHOD AND DEVICE FOR OPTICAL ANALYSIS OF PARTICLES
AT LOW TEMPERATURES

CLAIMS

1. A method for optical analysis of particles (2) contained in suspension in a fluid, at temperatures lower than dew point temperature, comprising the steps of:

i. arranging the particles in suspension within at least one microchamber (4) containing said fluid and delimited between a first and a second surface (5,6);

ii. thermally coupling the first surface (5), by means of a first thermal resistance (RLW), to first cooling means (7) adapted to subtract heat from the fluid, and thermally coupling the second surface (6), by means of a second thermal resistance (RHI), to an optical inspection surface (8);

iii. taking said fluid to a first temperature (T1), lower than dew point temperature, by means of said first cooling means;

iv. establishing at the optical inspection surface (8) a thermal flow (F) such that the optical inspection surface is constantly maintained at a second temperature (T2), higher than the dew point temperature (Td) of the ambient humidity contained in the air which laps on the optical inspection surface (8); said first and second thermal resistances being chosen so that the second thermal

resistance (RHI) has a thermal conductivity value, preferably, at least one order of magnitude lower than that of the first thermal resistance (RLW) and, in any cases, equal to at least half the thermal conductivity of the first thermal resistance (RLW).

2. A method according to claim 1, characterized in that step (iv) is carried out by heating the optical inspection surface (8) to above ambient air dew point.

3. A method according to claim 2, characterized in that the optical inspection surface is heated by joule effect, by arranging on the same, externally to the microchamber (4), a resistor (24b) chosen from the group consisting of: a transparent conductive resistive layer (25), e.g. ITO, applied uniformly on the entire optical inspection surface; a plurality of filiform micro resistors (26) arranged on the optical inspection surface, preferably arranged in a comb-shape, uniformly spaced apart with respect to one another.

4. A method according to claim 3, characterized in that said filiform micro resistors (26) are supplied so that the current density distribution is homogenous by using a current distribution frame (27) arranged in manner opposite to the filiform micro resistors, which receives, in turn, current by means of a plurality of conductor bridges (30), which connect a plurality of different points

(28) of the distribution frame, arranged on side opposite to the filiform micro resistors, to at least one common collector (31).

5. A method according to claim 2, characterized in that the optical inspection surface (8) is heated by forcing an air flow over the same.

6. A method according to claim 1, characterized in that step (iv) is carried out by cooling an amount of ambient air immediately surrounding the optical inspection surface (8) and which laps on the same at a temperature such that the dew point (T_d) of said amount of air is lower than said second temperature (T_2) of the optical inspection surface.

7. A method according to one of the claims from 2 to 6, characterized in that the temperature of the optical inspection surface is feedback controlled by continuously measuring the instant temperature (T_2) of the optical inspection surface, preferably by means of a resistor applied to said optical inspection surface (35), or by means of an infrared sensor arranged facing the optical inspection surface.

8. A method according to claim 7, characterized in that the temperature (T_2) at which maintaining the optical inspection surface is calculated as a function of the parameters ambient air temperature and ambient air

humidity, which are continuously detected by means of appropriate sensors.

9. An apparatus (1a,1b) for optical analysis of particles (2) contained in suspension in a fluid (3), at temperatures lower than dew point temperature, comprising:

- at least one microchamber (4) containing said fluid and delimited between a first (5) and a second (6) surface;

- first cooling means (7) which are thermally coupled with the first surface by means of a first thermal resistance (RLW) and are adapted to subtract heat from the microchamber by an amount such as to maintain said fluid at a predetermined first temperature (T1), lower than the dew point temperature; and

- an optical inspection surface (8) thermally coupled to the second surface by means of a second thermal resistance (RHI); characterized in that, in combination:

- the second thermal resistance (RHI) has a thermal conductivity value, preferably, of at least one order of magnitude, and even more preferably, of two orders of magnitude lower than that of the first thermal resistance (RLW) and, in all cases, equal to at least half the thermal conductivity of the first thermal resistance (RLW); and

- the apparatus further comprises means (24) for establishing at the optical inspection surface (8) a thermal flow (F) such that the optical inspection surface

is constantly maintained at a second temperature (T2), higher than the dew point temperature (Td) of the ambient humidity contained in the air which laps on the optical inspection surface (8) in use.

10. An apparatus according to claim 9, characterized in that it comprises means (24b;24c) for heating the optical inspection surface (8) to above ambient air dew point.

11. An apparatus according to claim 10, characterized in that said means for heating the optical inspection surface consist of a resistor (24b) constituted by: a transparent conductive resistive layer (25), e.g. ITO, applied uniformly on the entire optical inspection surface; or a plurality of filiform micro resistors (26) applied integrally in one piece on the optical inspection surface (8) and arranged on the same, preferably in a comb-shape, uniformly spaced apart with respect to one another.

12. An apparatus according to claim 11, characterized in that said filiform micro resistors (26) are electrically connected, all on the side of one end thereof, to a current distribution frame (27) constituted by a metal foil which receives electric current by means of a plurality of conductor bridges (30) which connect a plurality of different points (28) of the distribution frame, arranged on side opposite to the filiform micro resistors, to at

least one common collector (31) arranged at a base element (19) of the apparatus which supports the microchamber; said filiform micro resistors (26) having a width equal to approximately one tenth of the pitch between the same, in a direction traversal to their longitudinal extension.

13. An apparatus according to claim 9, characterized in that said means (24) for establishing said thermal flow (F) at the optical inspection surface (8) comprise forced ventilation means (40) of the optical inspection surface (8) and, preferably, heating or cooling means (41) of the forced ventilation flow.

14. An apparatus according to one of the claims from 9 to 13, characterized in that it comprises means (35) for measuring said second temperature (T2) and means (36;37) for actuating in feedback said means (24) for establishing said thermal flow (F) at the optical inspection surface (8); and preferably means for calculating the ambient air dew point (Td).

Fig. 1A is a schematic diagram of a device 1a. The device consists of a substrate 2 with a central channel 3. The channel contains a liquid 4 and a moving object 5. The channel is bounded by walls 6 and 7. The substrate has a top layer 8 and a bottom layer 10c. A force F is applied to the top layer 8. The channel is connected to a reservoir 11c. The device is shown in a cross-sectional view with various components labeled with numbers and letters.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

FIG. 1B

FIG. 1B is a schematic cross-sectional view of a device 1b. The device features a central channel 3 flanked by two hatched regions 4 and 6. Region 4 is labeled RHI and region 6 is labeled RLW. A horizontal line 14 separates the top and bottom parts of the device. Below the channel, there is a layer 10 and a substrate 18. A dashed box 11 is located within the substrate 18. A component 12 is shown to the right of the substrate. A component 21 is shown to the left of the channel. A force F is indicated by a double-headed arrow. Other labels include 16, 8, 2, 5, 15, and 24b.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

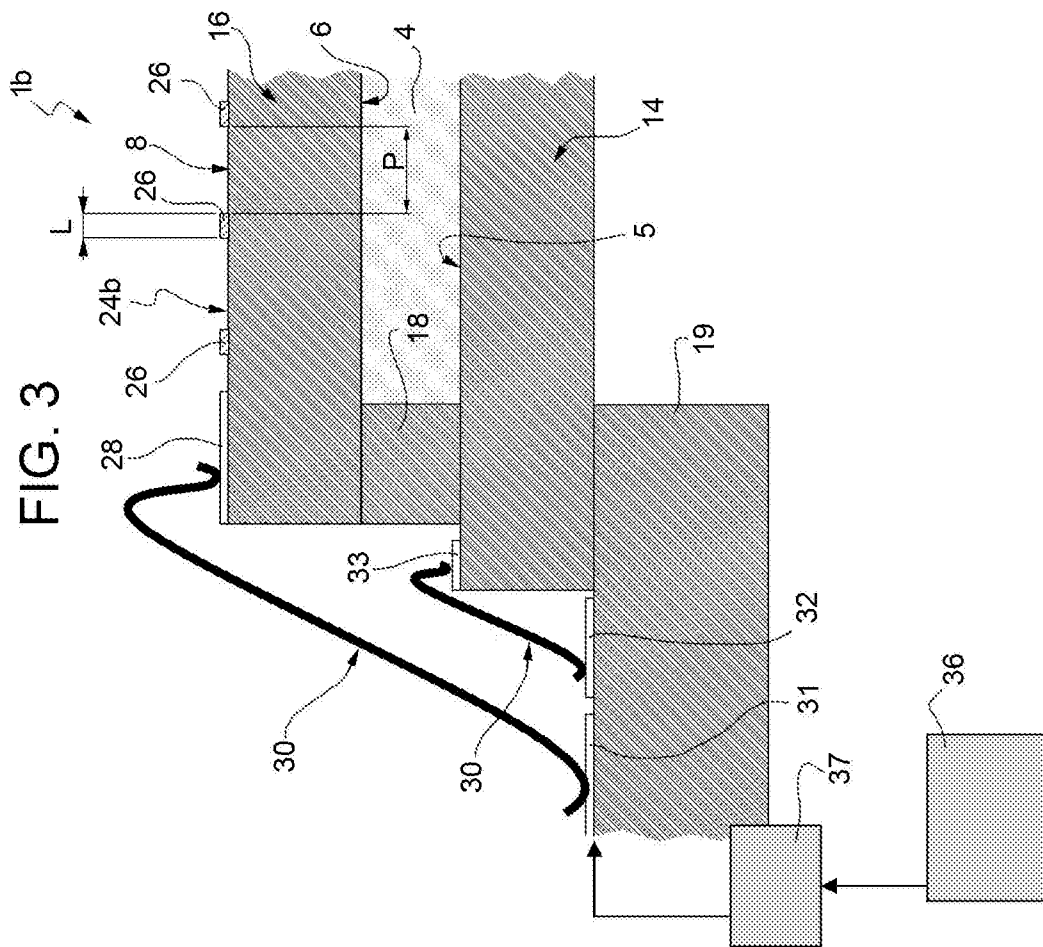
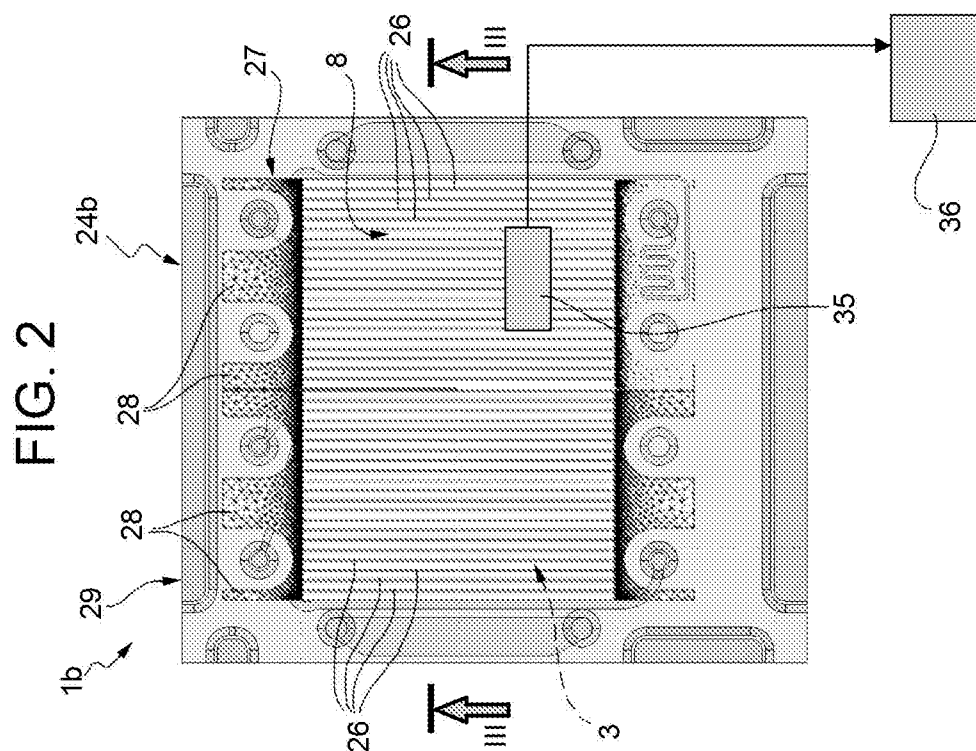


FIG. 4

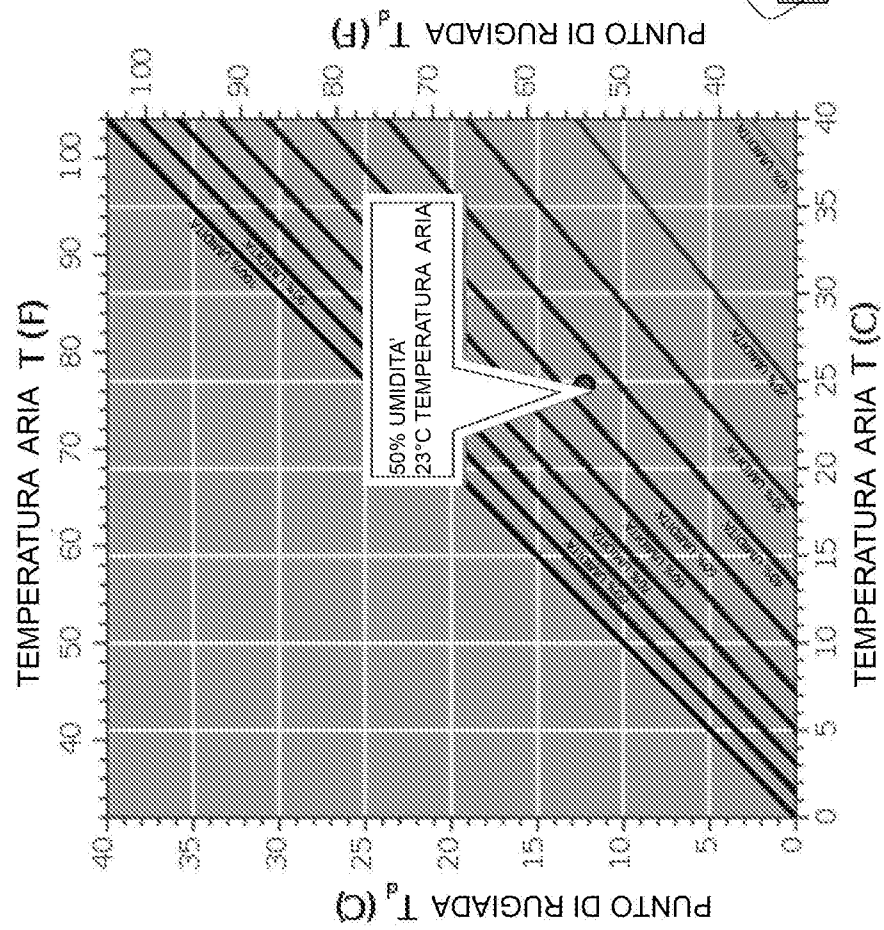


FIG. 5

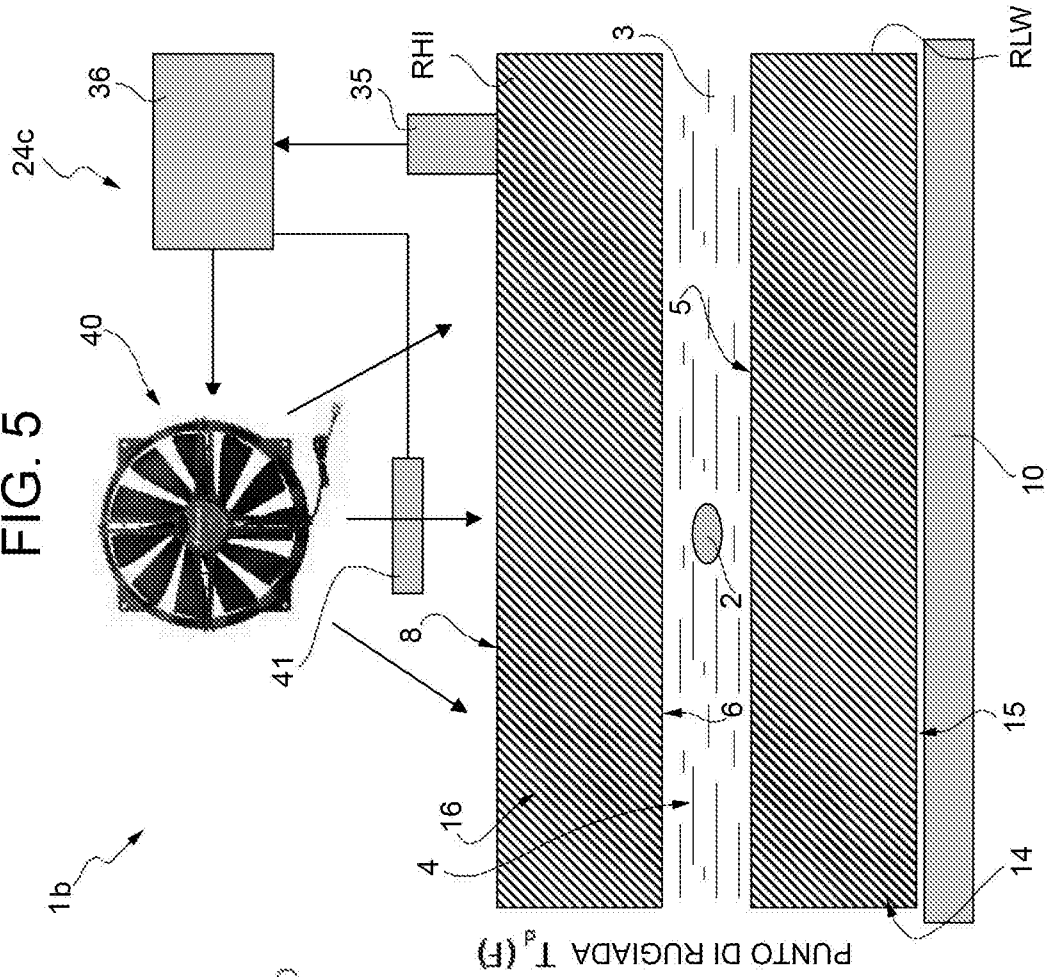


FIG. 6

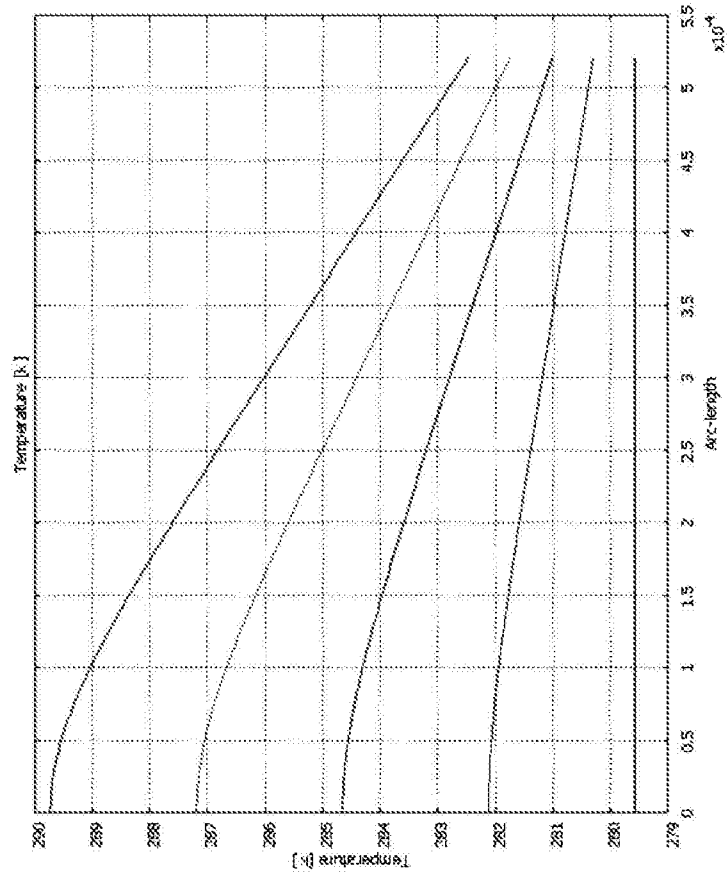


FIG. 7

