
POLITECNICO DI MILANO
Dipartimento di Ingegneria Industriale e
dell'Informazione

Corso di Laurea in Biomedical Engineering
(Biomechanics and Biomaterials)



**SVILUPPO E SPERIMENTAZIONE DI
NUOVE CONFIGURAZIONI PER
AUTOTEST MEDICI**

Relatore: Prof. G. A. Dubini
Correlatore: M. Piergiovanni
Tutor aziendale: L. Forte

Tesi di laurea di:
Matteo Martini
N. Matricola: 898121

Anno accademico 2018/2019

INDICE DEI CONTENUTI

<i>SVILUPPO E SPERIMENTAZIONE DI NUOVE CONFIGURAZIONI PER AUTOTEST MEDICI.....</i>	<i>1</i>
<i>Capitolo 1 Introduzione.....</i>	<i>1</i>
1.1 Prima Home Test	1
1.2 L'autotest diagnostico.....	2
1.2.1 Tecnologie di funzionamento e componenti.....	3
1.2.2 Kit Prima Home test	9
1.2.3 Costi e produzione	11
1.2.4 Criticità e problematiche.....	12
1.3 Requisiti di Progetto	14
1.4 Letteratura scientifica	15
1.4.1 Micro-fluidica e capillarità	15
1.4.2 La valvola capillare	17
1.4.3 Dimensionamento di una valvola capillare ad un livello	19
1.4.4 Dimensionamento di una valvola capillare a due livelli	21
1.4.5 Modelli analitici di capillarità.....	24
1.5 Ricerca Brevettuale	25
1.5.1 Parole chiave e classificazione dei brevetti.....	26
1.5.2 Meccanismo di controllo del diluente	28
<i>Capitolo 2 MATERIALI E METODI</i>	<i>29</i>
2.1 Processo di prototipazione.....	29
2.1.1 Tecnologia SLA e resina foto-polimerizzante	30
2.1.2 Validazione processo di prototipazione	32
2.1.3 Equazioni	34
2.2 Sperimentazione in laboratorio	35
2.2.1 Validazione dimensionamento valvola capillare.....	36

2.2.2	Protocollo di confronto e validazione.....	37
2.2.3	Preparazione strisce reattive	38
2.2.4	Preparazione soluzione diluente.....	42
2.2.5	Prelievo campioni di sangue.....	42
Capitolo 3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....		43
3.1	Validazione materiale e processo di prototipazione.....	43
3.2	Prove di tenuta della valvola ad un livello	47
3.3	Prove di tenuta valvole a due livelli	50
3.4	Sperimentazione tappo capillare	56
3.4.1	Test PSA.....	58
3.4.2	Test IgE totali	64
3.5	Sperimentazione chip capillare	67
3.5.1	Test per PSA.....	68
3.5.2	Test per IgE totali	71
3.6	Conclusioni.....	73
3.7	Sviluppi futuri.....	77
Bibliografia		78
APPENDICE		80
A.1	Script Matlab.....	80
A.1.1	Riempimento canale cilindrico.....	80
A.1.2	Riempimento canale rettangolare	81
A.2	Disegni meccanici.....	82
A.2.1	Chip capillare.....	82
A.2.2	Tappo capillare	83

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1: LOGO <i>PRIMA HOME TEST</i>	1
FIGURA 2: ALCUNI ESEMPI DEI PRODOTTI SVILUPPATI DA <i>PRIMA HOME TEST</i>	1
FIGURA 3: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'AUTOTEST DIAGNOSTICO PROTETTO DAL BREVETTO US6541277B1.	2
FIGURA 4: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL RICONOSCIMENTO DIRETTO ED UNIVOCO DI UN ANTIGENE SFRUTTANDO DUE DIVERSE IMMUNOGLOBULINE.	3
FIGURA 5: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DI UN LFA CON METODO SANDWICH.	5
FIGURA 6: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DI UN LFA CON METODO COMPETITIVO.....	5
FIGURA 7: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DI UN TEST COLORIMETRICO PER COLESTEROLO TOTALE. ...	6
FIGURA 8: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLE 5 COMPONENTI CHE COMPONGONO LA STRISCIA REATTIVA.	6
FIGURA 9: KIT VENDUTO DA <i>PRIMA HOME TEST</i> ALL'INTENRO DEL QUALE SONO CONTENUTI 1) LANCETTE PUNGI-DITO, 2) MICRO-PIPETTA CAPILLARE, 3) FLACONE DI DILUENTE, 4) CASSETTA CONTENENTE STRISCIA TEST, 5) GARZA DISINFETTANTE.....	9
FIGURA 10: IMMAGINI RELATIVE A DUE AUTOTEST PRESENTI IN COMMERCIO: A) AUTO-TEST PER HIV PROGETTATO DA <i>AAZ</i> E DEL COSTO DI 54 CHF, B) AUTO-TEST PRODOTTO DA <i>ADEXUS-DX</i> E CON UN COSTO DI 45.50 CHF.	12
FIGURA 11: IMMAGINE DELLA MICRO-PIPETTA CAPILLARE.....	13
FIGURA 12: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DELLE DIMENSIONI DI UN CIRCUITO MICRO-FLUIDICO... ..	15
FIGURA 13: IMMAGINE DEL CIRCUITO REALIZZATO DA WANG ET AL., IL QUALE È CARATTERIZZATO DALLA PRESENZA DI TRE STRATI IN MATERIALE DIFFERENTE.....	16
FIGURA 14: SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE OTTENIBILE ATTRAVERSO UN CAMBIO DI MATERIALE.	17
FIGURA 15: SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE OTTENIBILE ATTRAVERSO UN CAMBIO DI SEZIONE GARANTITO DALL'INCROCIO FRA DUE CANALI PERPENDICOLARI.	18

FIGURA 16: SCHEMA GENERALE DEL MECCANISMO DI BLOCCO E SUCCESSIVO SBLOCCO DELLA VALVOLA CAPILLARE. QUESTO PRINCIPIO È VALIDO PER ENTRAMBE LE TIPOLOGIE DI VALVOLE BASATE SU UN CAMBIO DI SEZIONE.....	19
FIGURA 17: SCHEMA GENERALE DELLA STRUTTURA DI UNA VALVOLA CAPILLARE AD UN LIVELLO, DOVE IL CAMBIO DI SEZIONE È GARANTITO DA UNA SEZIONE DIVERGENTE CON UN MINIMO ANGOLO PARI A β	21
FIGURA 18: RAPPRESENTAZIONE A DUE VISTE DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI, IN CUI È POSSIBILE COME L'AUMENTO DI SEZIONE SIA DOVUTO SIA AD UN AUMENTO DI SPESSORE CHE AD UN AUMENTO DI LARGHEZZA.....	21
FIGURA 19: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA I DUE PRINCIPALI BREVETTI ISOLATI DURANTE LA RICERCA BREVETTUALE.	27
FIGURA 20: SCHEMI DEI BREVETTI DECADUTI ED IPOTIZZATI IDONEI PER IL CONTROLLO DEL VOLUME DI DILUENTE.	28
FIGURA 21: SCHEMA RAPPRESENTATIVO DEL PROCESSO DI STEREOLITOGRAFIA.	29
FIGURA 22: IMMAGINE DELLA STAMPANTE FORM 2.....	30
FIGURA 23: IMMAGINE RELATIVA AL FORNO UV UTILIZZATO PER LA FASE FINALE DI POST-LAVORAZIONE DEI DISPOSITIVI STAMPATI IN 3D.....	31
FIGURA 24: IMMAGINE DEL MICROSCOPIO OTTICO UTILIZZATO PER LE ANALISI DI RUGOSITÀ SUPERFICIALE.	32
FIGURA 25: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA DUE GOCCE DI SANGUE DEPOSITATE SU LASTRE STAMPATE IN SLA. L'IMMAGINE MOSTRA GLI ANGOLI DI CONTATTO VALUTATI E L'OTTENIMENTO DEL VALORE NUMERICO ATTRAVERSO SOFTWARE <i>MATLAB</i>	33
FIGURA 26: SCRIPT <i>MATLAB</i> UTILIZZATO PER LA STIMA DELL'ANGOLO DI CONTATTO.....	33
FIGURA 27: SCHEMI GEOMETRICI DELLE CONFIGURAZIONI CONSIDERATE NEI MODELLI ANALITICI DI RIEMPIMENTO DEI CANALI.....	35
FIGURA 28: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DI UN LAMINATO ASSEMBLATO CON E SENZA <i>PAD</i> ASSORBENTE PER LA RACCOLTA DEL CAMPIONE DA ANALIZZARE. L'IMMAGINE RIPORTA I LAMINATI VENDUTI DALL'AZIENDA <i>MDI-MEMBRANE TECHNOLOGIES</i>	38
FIGURA 29: DETTAGLIO RELATIVO ALLE TRE POMPE UTILIZZATE DALL' <i>ISOFLOW DISPENSER</i> PER LA SEMINA DELLE STRISCE REATTIVE.	39
FIGURA 30: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DEL FUNZIONAMENTO DELLA <i>ISOFLOW DISPENSER</i>	39
FIGURA 31: RAPPRESENTAZIONE DI UNA NANO-PARTICELLA D'ORO RICOPERTA DI ANTICORPI.	40
FIGURA 32: <i>VIAL</i> CONTENENTE UN CAMPIONE DI SANGUE TRATTATO CON EDTA.	42
FIGURA 33: VISTA DEL DISPOSITIVO SU CUI SONO STATE EFFETTUATE LE PROVE DI RUGOSITÀ PER DETERMINARE L'IDONEITÀ DEL PROCESSO DI PROTOTIPAZIONE.	43

FIGURA 34: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA LA DISPOSIZIONE DEL PROTOTIPO ALL'INTERNO DEL PIANO DI STAMPA.....	44
FIGURA 35: IMMAGINE SCATTATA ATTRAVERSO UN MICROSCOPIO OTTICO E CHE MOSTRA IL FORTE ORIENTAMENTO DELLA RUGOSITÀ SUPERFICIALE.....	44
FIGURA 36: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA MORFOLOGIA SUPERFICIALE SULLA BASE DEI DATI DI RUGOSITÀ OTTENUTI AL MICROSCOPIO OTTICO.....	46
FIGURA 38: SEQUENZA RAPPRESENTANTE IL COMPORTAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE NELLA FASE DI RIEMPIMENTO.	49
FIGURA 39: IMMAGINE DI MICROSCOPIA RELATIVA AD UNA VALVOLA CAPILLARE AD UN LIVELLO. COME È POSSIBILE NOTARE, L'AUMENTO DI SEZIONE GARANTISCE IL BLOCCO DI UN FLUIDO SOLAMENTE NEL CASO DI UN CANALE DOTATO DI UNO SPESSORE MOLTO PIÙ ELEVATO RISPETTO ALLA LARGHEZZA.....	49
FIGURA 40: SCHEMA DEI DISPOSITIVI UTILIZZATI PER LA SPERIMENTAZIONE DEI PARAMETRI CHE INFLUENZANO IL FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI.....	50
FIGURA 41: IMMAGINI CHE TESTIMONIANO L'INEFFICIENZA DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI NEL CASO DI UN ΔH PARI A 500 μM	52
FIGURA 42: IMMAGINI RELATIVE ALL'EFFETTO DEL VOLUME DEL CAMPIONE SULLA TENUTA DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI. IN QUESTO CASO, SONO RAPPRESENTATE DE VALVOLA CONTENENTI RISPETTIVAMENTE 10 μL E 30 μL	53
FIGURA 43: IMMAGINI RELATIVE AL TAPPO CAPILLARE E AL CHIP CAPILLARE, DALLE QUALI È POSSIBILE NOTARE LA PRESENZA DI PIÙ CANALI PER RIUSCIRE AD ACCUMULARE E BLOCCARE UN VOLUME DI SANGUE PARI A 30 μL	54
FIGURA 44: IMMAGINI CHE MOSTRANO LA CAPACITÀ DEL TAPPO CAPILLARE DI MANTENERE ALL'ESTERNO DELLA CONFIGURAZIONE IL VOLUME DI SANGUE IN ECCESSO DEPOSITATO ALL'IMBOCCATURA DEL COMPONENTE.	57
FIGURA 45: IMMAGINI RELATIVE AL CONTROLLO QUALITÀ DELLE MEMBRANE REATTIVE.	58
FIGURA 46: IMMAGINE CHE MOSTRA IL RISULTATO VISIVO DI UN TEST PER PSA VALUTATO SU UN CAMPIONE DI SANGUE CON CONCENTRAZIONE DI 7 NG/ML E CHE RISULTA ESSERE CHIARAMENTE VISIBILE AD OCCHIO NUDO.....	59
FIGURA 47: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA IL LEAKAGE DI SANGUE DILUITO NEL CASO IN CUI VENGA DEPOSITATO UN VOLUME ECCESSIVO DI SOLUZIONE SULLA MEMBRANA, CHE RISULTEREBBE DUNQUE SATURATA.	62
FIGURA 48: RAPPRESENTAZIONE DELL'INTENSITÀ DELLE BANDE DI UN TEST PER IGE TOTALI RISPETTIVAMENTE DI UN CAMPIONE NEGATIVO E POSITIVO.....	64
FIGURA 49: IMMAGINE LATERALE E FRONTALE DEL DISPOSITIVO CHE MOSTRANO LA CAPACITÀ DELLA VALVOLA CAPILLARE DI TRATTENERE SOLO IL VOLUME DI SANGUE NECESSARIO PER IL TEST. ...	68

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1: PAROLE CHIAVE UTILIZZATE PER LA RICERCA BREVETTUALE.	26
TABELLA 2: SCHEMA RIASSUNTIVO DEL PROCESSO CON CUI SONO STATI SUDDIVISI I BREVETTI INDIVIDUATI IN LETTERATURA.	26
TABELLA 3: TABELLA RAPPRESENTATIVA DELLA TIPOLOGIA DI SPERIMENTAZIONE AVVIATA IN QUESTA FASE IN CUI VIENE INDAGATA LA RELAZIONE FRA <i>ASPECT RATIO</i> E VOLUME DI SANGUE A PARITÀ DI ΔH	36
TABELLA 4: DATO RELATIVI AI PARAMETRI DI SEMINA UTILIZZATI PER LA REALIZZAZIONE DELLE STRISCE TEST.	41
TABELLA 5: TABELLA CONTENENTE I PRINCIPALI DATI DI RUGOSITÀ DI INTERESSE NELL'ANALISI TRA CUI SCOSTAMENTO MEDIO DALLA SUPERFICIE TEORICA (R_A), SCOSTAMENTO QUADRATICO MEDIO DALLA SUPERFICIE TEORICA (R_Q) E MASSIMA DISTANZA PICCO-AVVALLAMENTO (R_T)....	45
TABELLA 6: TABELLA RIASSUNTIVA DELLE PROVE DI ANGOLO DI CONTATTO, CONTENENTE LE SOLUZIONI TESTATE E I DATI RELATIVI A MEDIA E DEVIATIONE STANDARD.	47
TABELLA 7: RACCOLTA DEI DATI OTTENUTI IN TERMINI DI MILLI-ASSORBANZA SUI TEST EFFETTUATI SULLA NUOVA CONFIGURAZIONE, RISPETTIVAMENTE SUI CAMPIONI NEGATIVI E POSITIVI.	59
TABELLA 8: DATI RELATIVI ALL'ASSORBANZA VALUTATA SUI TEST STANDARD.	60
TABELLA 9: TABELLE RIASSUNTIVE DEI VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTI SUL TEST STANDARD PER IGE.....	65
TABELLA 10: TABELLE RIASSUNTIVE DEI VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTI UTILIZZANDO IL TAPPO CAPILLARE SUL TEST PER IGE TOTALI.....	65
TABELLA 11: TABELLE RIASSUNTIVE DEI DATI RICAVATI DURANTE L'ANALISI DI ASSORBANZA DI CAMPIONI POSITIVI E NEGATIVI AL TEST PER PSA.....	69
TABELLA 12: TABELLE CONTENENTI I DATI RELATIVI AL CHIP CAPILLARE APPLICATO AL TEST PER IGE TOTALI, RISPETTIVAMENTE PER CAMPIONI NEGATIVI E CAMPIONI POSITIVI.....	71
TABELLA 13: SCHEMA RIASSUNTIVO DELLO STATO DELLE DUE CONFIGURAZIONI ANALIZZATE RISPETTO AI REQUISII DI PROGETTO FISSATI ALL'INIZIO DELLA TRATTAZIONE.....	77

INDICE DELLE EQUAZIONI

EQUAZIONE 1: FORMULA UTILIZZATA PER DETERMINARE LA PRESSIONE INDOTTA DALLA VALVOLA CAPILLARE IN FUNZIONE DI PARAMETRI GEOMETRICI E FISICI APPARTENENTI AL FLUIDO E AL CIRCUITO.....	20
EQUAZIONE 2: FORMULA CHE PERMETTE DI DETERMINARE IL MINIMO ANGOLO DI CONTATTO RICHIESTO PER CREARE UNA VALVOLA CAPILLARE AD UN LIVELLO.	20
EQUAZIONE 3: EQUAZIONE CHE DESCRIVE LA PRESSIONE CAPILLARE IN UN CANALE RETTANGOLARE IN SEGUITO AD UN CAMBIO DI SEZIONE IMPOSTO DALL'ANGOLO β	22
EQUAZIONE 4: EQUAZIONE RELATIVA AL BILANCIO DI FORZE AGENTI SU UN VOLUME DI FLUIDO CHE SCORRE IN UN CANALE.	25
EQUAZIONE 5: EQUAZIONI DIFFERENZIALI RELATIVE AL BILANCIO DI FORZE AGENTI SUL VOLUME DI FLUIDO NEL CASO DI GEOMETRIA RETTANGOLARE E CILINDRICA.....	34
EQUAZIONE 6: FORMULA CHE PERMETTE DI CALCOLARE L'ANGOLO LIMITE DI BAGNABILITÀ DELLA SUPERFICIE CHE LA GOCCIA DI FLUIDO PUÒ RAGGIUNGERE.....	46

INDICE DEI GRAFICI

GRAFICO 1: GRAFICO REALIZZATO DA <i>LEU ET AL.</i> CHE DESCRIVE LA CADUTA DI PRESSIONE DI UNA VALVOLA CAPILLARE IN FUNZIONE DELL' <i>ASPECT RATIO</i> E DELL'ANGOLO IMPOSTO PER INDURRE IL CAMBIO DI SEZIONE.	22
GRAFICO 2: GRAFICI CHE MOSTRANO CURVE DI SUCCESSO RELATIVE ALLA TENUTA DELLA VALVOLA CAPILLARE IN FUNZIONE DELLA DIFFERENZA DI ALTEZZA DEI CANALI A CAVALLO DELLA VALVOLA E IN FUNZIONE DELLE DIMENSIONI DEL CANALE RETTANGOLARE.	23
GRAFICO 3: GRAFICI CHE MOSTRANO L'ANDAMENTO DELLE CURVE DI SUCCESSO IN FUNZIONE DEI PARAMETRI CONSIDERATI NELLA FASE D PROGETTAZIONE. IN PARTICOLARE, SONO RIPORTATE LE CURVE DI SUCCESSO NEI TRE PRINCIPALI CASI DI ΔH , OVVERO A) 1000 μM B) 1500 μM C) 2000 μM	51

ABSTRACT

Il *lateral flow immunoassay* (LFA) è un metodo diagnostico che si basa sul riconoscimento immunologico univoco di un antigene all'interno di un campione biologico analizzato. Tale approccio è sfruttato per la produzione industriale di autotest medici, ovvero kit acquistabili da un generico utente e che permettono all'utilizzatore di valutare la presenza o l'assenza dell'antigene di interesse senza la necessità di essere assistito da un operatore specializzato. I kit commercialmente disponibili sono caratterizzati tuttavia da alcuni aspetti critici che possono rendere il test di difficile utilizzo e interpretazione. La seguente trattazione ha lo scopo di analizzare in particolare le criticità legate al prelievo dell'esatto volume di campione necessario, ponendosi come principale obiettivo l'individuazione di un meccanismo brevettabile che possa semplificare gli aspetti appena evidenziati. In seguito ad una validazione del processo di prototipazione utilizzato e allo studio di bagnabilità del materiale disponibile per la sperimentazione, sono stati determinati i parametri geometrici di progetto che hanno portato alla progettazione di due differenti configurazioni. Esse sono state confrontate con la configurazione attualmente in uso da un punto di vista della funzionalità e i dati a disposizione suggeriscono la possibile validità delle soluzioni progettuali individuate. Tuttavia, è opportuno sia ampliare la popolazione statistica, sia effettuare una sperimentazione sui materiali e le lavorazioni idonee alla realizzazione del prodotto finito per poter affermare con certezza la loro validità.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Prima Home Test



Figura 1: Logo *Prima Home test*.

La *Prima Home Test* (Figura 1) è un'azienda di diagnostica con sede commerciale e produttiva a Balerna, Chiasso (CH). Nasce nel 2014 con l'obiettivo di sviluppare e produrre industrialmente kit utilizzabili per svolgere autotest medici. Tali prodotti forniscono all'utente che li acquista strumenti che permettono di verificare la presenza di uno specifico antigene all'interno di un fluido biologico. Questa procedura viene svolta dal paziente in maniera completamente autonoma, ovvero senza la necessità di dover essere assistito da un operatore specializzato. Al momento, il catalogo dei prodotti venduti comprende 24 differenti autotest certificati dal punto di vista della produzione, della qualità e dell'affidabilità (Figura 2).



Figura 2: Alcuni esempi dei prodotti sviluppati da Prima Home Test.

Tale elenco è attualmente in crescita dal punto di vista della varietà dei prodotti ed inoltre, il loro sviluppo è accompagnato dalla ricerca di nuove tecnologie e strumenti in grado di rendere ciascun test più efficiente, sicuro e di facile utilizzo. Tutti i prodotti venduti si basano sul concetto di test qualitativo o semi-quantitativo, ovvero permettono di individuare se, all'interno del campione analizzato, la concentrazione di una determinata molecola o proteina sia al di sopra di un certo valore soglia o all'interno di uno specifico intervallo di concentrazioni. In altre parole, i test sviluppati non sono in grado di determinare il valore nominale di concentrazione della specie considerata. Infine, è necessario ricordare come tali test vengano utilizzati per effettuare principalmente screening diagnostici di massa, ovvero individuano la presenza di un antigene correlato ad un alto rischio di insorgenza di una specifica patologia, ma non sono in grado di determinare la presenza effettiva della stessa. Quest'ultima infatti è individuabile solamente attraverso esami strumentali più approfonditi.

1.2 L'autotest diagnostico

Nonostante il mercato degli autotest e la presa di coscienza della loro esistenza da una fetta più ampia di persone si stiano sviluppando in tempi più recenti, questo metodo diagnostico si basa su una tecnologia che risulta essere nota già da tempo e che inizialmente era conosciuta con il nome di *Sol Particle Immunoassay* (SPIA) (Posthuma-Trumpie, et al., 2009). Compiendo infatti una ricerca all'interno della letteratura brevettuale è possibile individuare una vasta quantità di brevetti legati a tale ambito, alcuni dei quali presentano una data di priorità antecedente al 1990. Due esempi di questo genere sono i brevetti US4313734A e US6541277B1 (Figura 3), rispettivamente con date di priorità stabilite nel 1979 e 1989.

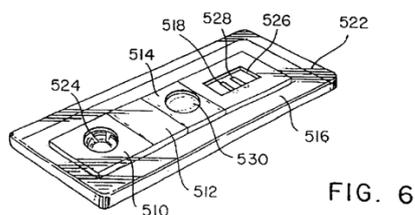


Figura 3: Rappresentazione schematica dell'autotest diagnostico protetto dal brevetto US6541277B1.

Inizialmente, lo SPIA iniziò ad essere utilizzato per realizzare test di gravidanza a basso costo e di semplice utilizzo. Successivamente, riconosciuti quelli che sono i numerosi vantaggi legati a questa tipologia di metodo diagnostico, la sua applicazione venne ampliata anche in ambiti diversi da quello clinico, come ad esempio l'ambito veterinario e alimentare (Ching, 2015). In ognuno di questi ambiti, lo SPIA era utilizzato non solo con fini diagnostici ma anche con fini di monitoraggio. Al momento, tale tecnologia viene maggiormente riconosciuta con il nome di *Lateral Flow Immunoassay (LFIA o LFA)* ed è alla base dell'approccio adottato per la produzione industriale degli autotest precedentemente citati (Kozcula & Gallotta, 2016).

1.2.1 Tecnologie di funzionamento e componenti

Entrando più nello specifico di quello che è il processo produttivo che porta alla realizzazione di un autotest, per prima cosa è necessario approfondire il suo principio di funzionamento. Come già detto in precedenza, questo metodo diagnostico si basa sull'individuazione di una determinata specie chimica posta all'interno di una soluzione complessa. La specie di interesse viene definita in questo ambito con il nome di antigene e il suo riconoscimento avviene generalmente attraverso un meccanismo di tipo immunologico (Candiani, 2019). Questo processo di riconoscimento è portato a termine sfruttando delle immunoglobuline, ovvero glicoproteine prodotte dal sistema immunitario e specifiche per un determinato antigene (Figura 4).

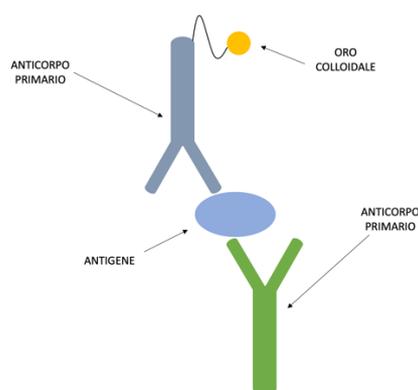


Figura 4: Rappresentazione schematica del riconoscimento diretto ed univoco di un antigene sfruttando due diverse immunoglobuline.

Tale riconoscimento è dovuto al fatto che sulla superficie di un antigene sono presenti delle particolari zone, chiamate epitopi, le quali sono riconosciute attraverso un meccanismo di complementarità dalle regioni variabili delle immunoglobuline, chiamate paratopi. In natura

non esistono due diversi antigeni che condividono due epitopi identici, motivo per cui è necessario utilizzare due immunoglobuline, appartenenti a famiglie differenti di glicoproteine, per individuare in maniera univoca l'antigene interessato nell'analisi (Candiani, 2019). Questa operazione viene messa in atto sulla superficie di membrane reattive appositamente progettate, sulle quali possono essere riconosciuti tre differenti gruppi di anticorpi:

- **Anticorpi per oro colloidale:** sono immunoglobuline utilizzate per saturare la superficie delle nano-particelle d'oro, le quali sono caratterizzate da una colorazione macroscopicamente visibile e dipendente dalla loro concentrazione. Il ruolo di queste particelle è quello di rendere visibile la posizione degli anticorpi a loro legati sulla superficie della membrana reattiva. In questo caso possono essere utilizzati sia anticorpi primari che secondari, conosciuti anche con il nome di anti-anticorpi, a seconda delle caratteristiche dell'antigene che si vuole individuare. In particolare, se quest'ultimo è a sua volta un anticorpo vengono utilizzate immunoglobuline secondarie, altrimenti vengono utilizzate immunoglobuline primarie. Tale complesso è il primo elemento con cui l'antigene entra in contatto e permette una sua prima marcatura;
- **Anticorpi per banda test:** esattamente come il caso precedente, possono essere utilizzati sia anticorpi primari che secondari in funzione dell'antigene trattato. Il loro compito è quello di completare il riconoscimento di quest'ultimo, portando dunque ad una sua un'identificazione univoca;
- **Anticorpi per banda di controllo:** in questo caso sono usate solamente immunoglobuline secondarie, il cui compito è quello di riconoscere e legarsi agli anticorpi liberi presenti sulla superficie delle nano-particelle d'oro. Per questo motivo, la banda di controllo è visibile sulla superficie della membrana reattiva indipendentemente dalla negatività o positività del campione e viene utilizzata semplicemente come feedback visivo per testimoniare il corretto funzionamento del test.

Un altro aspetto che occorre sottolineare in questo ambito è la diversa strategia con cui i test possono essere realizzati. In particolare, i due principali metodi sfruttati sono i seguenti (Kozcula & Gallotta, 2016):

- Metodo Sandwich:** l'antigene di interesse viene per prima cosa legato alle immunoglobuline primarie marcate con oro colloidale e successivamente, il complesso formatosi entra in contatto con le immunoglobuline depositate sulla banda test (Figura 5). Questo è il metodo prevalentemente utilizzato in questo ambito ed è caratterizzato dalla comparsa della banda test solamente nel caso in cui il paziente risulti essere positivo. Viene generalmente utilizzato per test qualitativi.

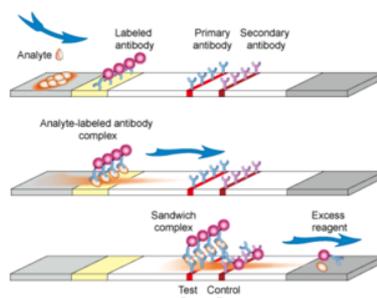


Figura 5: Principio di funzionamento di un LFA con metodo sandwich.

- Metodo competitivo:** viene utilizzato soprattutto per piccole molecole, come ad esempio i test utilizzati per identificare la presenza di albumina all'interno di un campione, dal momento che queste sostanze presentano pochi siti di legame sulla loro superficie. In questo caso le immunoglobuline seminate sulla banda test sono già legate all'antigene di interesse (Figura 6). Durante il test, l'antigene presente nel campione si lega agli anticorpi coniugati alle nano-particelle d'oro portando ad una saturazione dei loro siti di legame. In questo modo, essi non possono legarsi all'antigene depositato sulla banda test e la presenza dell'antigene nel campione è dunque evidenziata dall'assenza della banda test. In altre parole, l'interpretazione del risultato visivo di questo test è l'opposto del metodo competitivo precedentemente descritto;

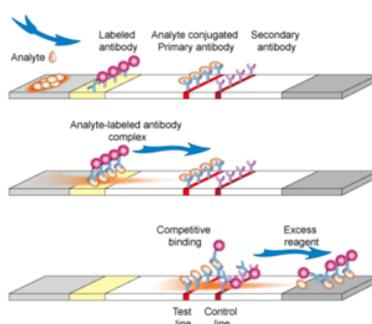


Figura 6: Principio di funzionamento di un LFA con metodo competitivo.

Un ulteriore metodo utilizzato in questo campo, ma che risulta essere di minore interesse in relazione a quanto trattato in seguito, è quello enzimatico-colorimetrico. Questo approccio viene sfruttato ad esempio nel caso del test semi-quantitativo per il colesterolo, durante il quale la molecola viene ossidata attraverso l'uso dell'enzima colesterolo ossidasi e successivamente, reagendo con un colorante, viene prodotta sulla striscia test una colorazione con intensità proporzionale alla concentrazione di colesterolo ossidato (Figura 7).



Figura 7: Immagine rappresentativa di un test colorimetrico per colesterolo totale.

Indipendentemente da quello che è il metodo utilizzato, tali test vengono attuati sulla superficie di strisce reattive. Esse sono solitamente acquistate in laminati preventivamente assemblati, successivamente seminati con immunoglobuline e tagliati a macchina da un operatore. Tali strisce reattive presentano una struttura rettangolare, la cui larghezza è pari a 5mm, mentre per quanto riguarda la loro lunghezza essa è pari a 63mm o 93mm a seconda della tipologia di test che si sta trattando. Per quanto riguarda lo spessore, esso è variabile all'interno della struttura stessa della striscia a causa delle diverse membrane utilizzate per realizzarla. Infatti, oltre ad avere membrane con caratteristiche e spessori differenti, per poter garantire il corretto passaggio di fluidi fra l'una e l'altra attraverso un fenomeno di capillarità, esse vengono sovrapposte nei loro punti di congiunzione (Figura 8). Le principali componenti di cui è fatta una striscia reattiva sono cinque e le loro caratteristiche sono riassunte come segue (NanoComposix, 2018):

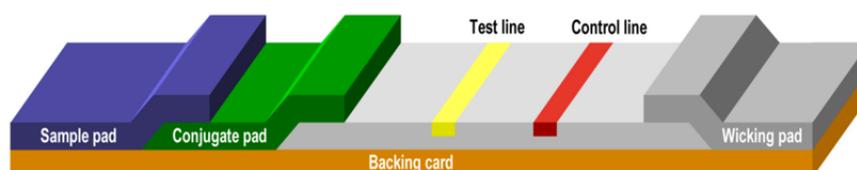


Figura 8: Rappresentazione schematica delle 5 componenti che compongono la striscia reattiva.

-
- **Sample Pad:** corrisponde alla prima porzione della striscia test e su di esso viene depositato il campione di fluido biologico da analizzare. Il materiale di cui è fatta questa membrana dipende dal tipo di campione considerato, parametro che influenza anche i possibili trattamenti a cui una membrana può essere sottoposta per la standardizzazione dei campioni. Nel caso di campioni salivari, vengono utilizzate delle membrane realizzate in fibra di vetro (*Gfbr-4*) non tessuta, mentre nel caso di campioni di urina e sangue sono utilizzate membrane con fibre di cellulosa rispettivamente non tessute e tessute. Facendo particolare riferimento alle membrane atte a trattare campioni di sangue, esse vengono chiamate comunemente *blood separator*, dal momento che la struttura tessuta che le caratterizza si comporta come un filtro in grado di bloccare i globuli rossi e far avanzare solamente il plasma. Questa struttura si rende necessaria per test su sangue dal momento che la componente cellulare in esso contenuta potrebbe sia interferire con il riconoscimento dell'antigene, sia rendere difficoltoso il moto del plasma all'interno della striscia. Inoltre, la presenza dei globuli rossi creerebbe una colorazione rossastra sulla nitrocellulosa e ciò renderebbe difficoltosa la lettura del risultato del test da parte dell'utente;
 - **Conjugate Pad:** è una delle componenti fondamentali della striscia reattiva. All'interno del suo volume infatti, viene depositata la soluzione di nano-particelle d'oro marcate. Fluendo in questa zona, l'antigene presente nel campione viene marcato e avanza verso la zona successiva della striscia. Tale membrana è realizzata anch'essa in fibra di vetro, in modo tale che siano garantite delle buone pressioni capillari sui fluidi trattati, facendoli fluire correttamente verso la zona successiva della striscia reattiva;
 - **Membrana in Nitrocellulosa:** è la membrana più lunga e sottile fra quelle che costituiscono la striscia reattiva (la sua lunghezza è variabile fra i 20mm e i 25mm mentre lo spessore risulta essere pari a circa 0.1mm) e su di essa vengono seminate le due bande di immunoglobuline. La loro posizione deve essere opportunamente studiata, dal momento che tale parametro incide sulla specificità e sensibilità del test. In questo specifico caso, per poter uniformare i test dal punto di vista della produzione, nel caso delle strisce da 63mm le posizioni di banda test e banda di controllo sono collocate rispettivamente a 32mm e 37mm a partire dall'inizio del *sample pad*. Nel caso delle strisce da 93mm invece, la semina avviene rispettivamente a 51mm e 56mm. La funzione principale di questa membrana è quella di fornire una superficie di semina per le immunoglobuline;

-
- **Wicking Pad:** è l'ultima componente presente all'interno della struttura della striscia reattiva ed è solitamente realizzata in fibre di cellulosa non tessute. La sua presenza ha una doppia funzione. Questa membrana assorbente viene infatti utilizzata per evitare sia che si verifichino dei fenomeni di retro-flusso, sia per evitare che la membrana in nitrocellulosa venga saturata dalla soluzione depositata. In questo modo, vengono evitati fenomeni di interferenza (o cross-interferenza) nell'individuazione dell'antigene di interesse;
 - **Backing Card:** è solitamente realizzata in *HIPS* (Polistirene ad Alto Impatto). La sua unica funzione è quella di fornire una superficie sulla quale posizionare le membrane precedentemente descritte, le quali vengono tenute in posizione attraverso l'utilizzo di un'opportuna colla distribuita su un lato della *backing card*. Dal punto di vista delle dimensioni, tale membrana ha le dimensioni della striscia globale ed è dotata di uno spessore di circa 0.6mm.

Infine, l'ultimo elemento fondamentale per la realizzazione di un *LFA* è la soluzione diluente. Essa è una soluzione acquosa contenente detergenti, il cui ruolo è quello di andare ad isolare l'antigene contenuto in un fluido biologico complesso. L'utilizzo di queste soluzioni non solo permette di migliorare l'affinità fra anticorpo e antigene, ma garantisce anche una diluizione del campione garantendone dunque un moto più efficiente attraverso le membrane. Esistono diverse tipologie di detergenti, i quali possono essere suddivisi in due macro-categorie: detergenti ionici e non ionici. I primi, come ad esempio il *Sodio-Dodecil-Solfato (SDS)*, sono caratterizzati da un'alta efficienza in termini di isolamento proteico ma sono accompagnati dalla linearizzazione della struttura proteica e da un maggior rischio di lesione del comparto cellulare (Tukmachev, et al., 1979). Vengono solitamente utilizzati quando il riconoscimento dell'antigene avviene attraverso l'individuazione di sequenze di amminoacidi e non attraverso un riconoscimento di forma. I secondi invece, come il *Triton X-100* e il *Tween-20*, hanno una minore efficienza in termini di isolamento proteico ma non danneggiano le cellule presenti in sospensione (Domingues, et al., 2009). In questo modo, considerando ad esempio dei test su sangue, è possibile evitare che le componenti biologiche contenute sulla superficie e all'interno dei globuli rossi vengano rilasciati sulla membrana, evitando dunque la comparsa di cross-interferenti e di una colorazione rossastra sulla membrana in nitro-cellulosa. Questi detergenti vengono usati per via della loro struttura ramificata, la quale svolge la funzione di distanziatore fra le varie componenti poste in soluzione, aumentando dunque l'affinità fra antigene e anticorpo. Per questi motivi, il volume di soluzione

diluyente richiesto e la sua composizione dipendono dalle proprietà e dai volumi dei detergenti utilizzati, oltre che dalle caratteristiche dell'antigene, la sua concentrazione nel campione fluido e la minima sensibilità che si vuole ottenere.

1.2.2 Kit Prima Home test

Come già anticipato nella sezione precedente, un kit che permetta di effettuare un autotest diagnostico in maniera efficiente deve essere composto da un meccanismo di prelievo del campione da analizzare, seguito da un opportuno trattamento attraverso una soluzione diluente e la successiva deposizione su una membrana reattiva. Il tutto, deve avvenire attraverso operazioni svolgibili da un utente non specializzato e garantendo una finestra di lettura del risultato in un intervallo di tempo che sia il più breve possibile. Esistono commercialmente differenti tipologie di kit in grado di soddisfare i precedenti requisiti. Quello venduto attualmente da *Prima Home Test* presenta una configurazione che risulta essere al momento la più diffusa e riconosciuta commercialmente (Figura 9).



Figura 9: Kit venduto da *Prima Home Test* all'interno del quale sono contenuti 1) Lancette Pungi-dito, 2) Micro-pipetta capillare, 3) Flacone di diluente, 4) Cassetta contenente striscia test, 5) Garza disinfettante.

Essa è caratterizzata dalla presenza dei seguenti componenti:

- 1) Lancetta Pungi-dito:** è il primo componente ad essere utilizzato e permette di creare una lesione mininvasiva sulla cute dell'utente che la utilizza. Solitamente, tale lesione viene creata in corrispondenza del dito medio o anulare della mano del paziente. Comprimendo successivamente la cute nella zona circostante la lesione è possibile rendere disponibile un certo volume di sangue capillare che può essere prelevato e analizzato;

-
- 2) Micro-pipetta capillare:** è lo strumento con cui viene prelevato il precedente volume di sangue accumulatosi sulla superficie cutanea del paziente. Tale componente lavora per capillarità, ovvero permette di prelevare il volume di sangue desiderato attraverso un meccanismo passivo, basato sulla tensione superficiale che si crea all'interfaccia fra il sangue e il materiale di cui è composto lo strumento. Può essere realizzata in solo materiale polimerico, solitamente Polietilene, oppure può anche essere dotata di un ulteriore capillare interno, realizzato generalmente in Policarbonato. Con l'aggiunta di un'anima in materiale polimerico vetroso infatti, il prelievo per capillarità può essere ottimizzato e reso più efficiente. Il volume di sangue da prelevare con lo strumento dipende dalla concentrazione di antigene che si vuole andare a rilevare. Tale volume varia generalmente fra 10 μL e 50 μL per gli antigeni rispettivamente molto concentrati e poco concentrati. Successivamente, premendo il bulbo deformabile della pipetta, il volume di sangue viene depositato sul *sample pad* attraverso la presenza di un apposito pozzetto;
- 3) Flacone di diluente:** contiene la miscela diluente che deve essere applicata al campione di interesse. Tale componente è dotato di un tappo e un copri-tappo. Il primo elemento viene utilizzato come dispensatore di gocce e il loro numero dipende dal grado di diluizione richiesto da quel particolare test. I tappi utilizzati al momento permettono di dispensare mediamente un volume di 30 μL ad ogni goccia;
- 4) Cassetta e striscia reattiva:** possono essere considerati come un unico componente. La striscia è inserita all'interno della cassetta, la quale presenta al suo interno un opportuno alloggiamento che permette di immobilizzarla e posizionare le varie membrane che la compongono correttamente rispetto alle aperture presenti su di essa. In particolare, essa deve permettere di allineare efficacemente la finestra di lettura con la banda di controllo e la banda test, mentre il *sample pad* deve essere allineato con il pozzetto in cui dispensare sangue e diluente;
- 5) Garza disinfettante:** è l'unico componente che non è funzionale alla buona riuscita del test, ma viene solamente utilizzato per disinfettare la cute del paziente in corrispondenza della zona di lesione al termine delle operazioni.

1.2.3 Costi e produzione

Come accennato in precedenza, i costi produttivi legati ai kit di questo tipo risultano essere in generale molto bassi. Considerando la configurazione appena presentata, la maggior parte degli elementi che la compongono vengono acquistati esternamente all'azienda, all'interno della quale vengono dunque effettuate operazioni di semina di immunoglobuline in camera secca, sagomatura delle strisce reattive, riempimento dei flaconi, assemblaggio e inscatolamento del kit. Tenendo conto di tutte le operazioni da svolgere e di tutti i componenti, il kit finale costa all'azienda all'incirca 1,5 €. Alcuni costi per la produzione, come ad esempio il costo unitario della micro-pipetta, del flacone e della cassetta in HDPE sono costi fissi e indipendenti dal tipo di test che si sta producendo. Per quanto riguarda i costi variabili invece, essi dipendono dalla concentrazione della sospensione di oro colloidale, dalla densità delle bande di anticorpi e dalla composizione della soluzione diluente. In generale, la maggior parte dei costi è da imputare a quelle che sono le operazioni svolte all'interno dell'azienda e necessarie per ottenere il prodotto finito. Nonostante ciò, se si considerano vasti volumi di produzione, è altrettanto vero che il contenimento di alcuni costi fissi legati ai componenti precedentemente citati risulterebbe essere fondamentale. La micro-pipetta è al momento il componente acquistato esternamente che più va ad incidere sul prezzo totale del test, dunque la sua rimozione dal kit potrebbe essere un buon metodo sia per ridurre le operazioni da svolgere, sia per ridurre i costi sull'intera produzione. Tuttavia, bisogna ricordare come il cambio di configurazione abbia come svantaggio la modifica di alcuni aspetti produttivi e dei quali bisogna tenere necessariamente conto. Ad esempio, nel momento in cui si decidesse di utilizzare materiali plastici differenti o componenti caratterizzati da un design differente, sarebbe necessaria la realizzazione di un nuovo stampo ad iniezione. Tale operazione sarebbe un investimento economicamente rilevante e impattante anche sul processo di produzione. Per questo motivo, nella trattazione che segue, non solo si terrà conto di quelle che sono le modifiche implementate per rendere il test più efficace, ma verranno valutate anche quelle che sono le conseguenze dal punto di vista economico e produttivo che accompagnano le configurazioni analizzate. Il controllo di questi parametri è fondamentale dal momento che ha come diretta conseguenza il prezzo finale con il quale l'autotest sarà reso disponibile al pubblico. Facendo infatti riferimento ad alcuni test in commercio (Figura 10), il prezzo disponibile al pubblico di alcuni di essi è molto elevato a causa di costi di produzione, ricerca e sviluppo altrettanto elevati. Dunque, la minimizzazione dei costi produttivi si rivela fondamentale per il mantenimento di un prezzo accessibile per gli acquirenti.

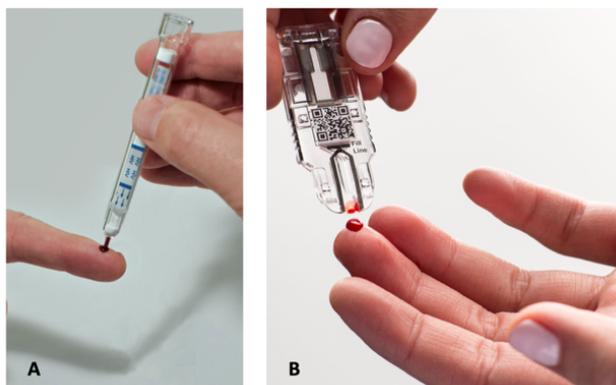


Figura 10: Immagini relative a due autotest presenti in commercio: A) Auto-test per HIV progettato da AAZ e del costo di 54 CHF, B) Auto-test prodotto da Adexus-DX e con un costo di 45.50 CHF.

1.2.4 Criticità e problematiche

Facendo riferimento alla configurazione descritta finora, essa è caratterizzata da determinati aspetti critici che si ripercuotono sia sul costo del test che sul suo efficace utilizzo.

Il componente più critico al momento è la micro-pipetta capillare. Innanzitutto, come già anticipato, è un componente costoso e la sua rimozione garantirebbe l'abbassamento del costo di produzione. Inoltre, necessitando di capillari in vetro o policarbonato per ottimizzare il prelievo di sangue, non può essere inserito all'interno di un impianto di confezionamento e assemblaggio automatizzato. In una condizione del genere infatti, quello che si potrebbe verificare è la rottura o lo sbeccamento dell'anima in vetro contenuta nello strumento, il che non solo comporterebbe la vendita di un autotest non utilizzabile, ma anche la vendita di un dispositivo potenzialmente pericoloso per l'utente. Per questo motivo, lo strumento necessita di essere inserito manualmente all'interno della confezione da un operatore presente sulla linea di produzione. Considerando più nel dettaglio il suo meccanismo di funzionamento, come già anticipato il prelievo di sangue avviene mediante capillarità ed una volta accumulato il volume di sangue richiesto, esso viene depositato sulla striscia reattiva. Per portare a termine quest'ultima operazione, deve essere premuto il bulbo deformabile presente sullo strumento. Quest'ultimo aspetto rende l'utilizzo del test contro-intuitivo, dal momento che tale bulbo viene spesso utilizzato dagli utenti come meccanismo per creare all'interno dello strumento il vuoto necessario per prelevare il campione. Tutto ciò porta spesso all'incapacità di accumulare il volume esatto di sangue nella micro-pipetta, condizione che è spesso accompagnata anche dalla formazione di bolle d'aria. Tutto ciò porta alla riduzione del campione a disposizione per le analisi, rendendo quindi il test meno efficiente. Infine, questo strumento non è dotato di un

meccanismo in grado di prelevare l'esatto volume di sangue, ma è semplicemente dotato di una tacca posta sulla sua superficie esterna che segnala visivamente il raggiungimento della quantità di campione necessaria (Figura 11).



Figura 11: Immagine della micro-pipetta capillare.

L'accumularsi di tutti questi errori inciderebbe in maniera estremamente negativa sulla buona riuscita del test, dal momento che il prelievo di un volume di sangue che si distacca eccessivamente da quello richiesto porterebbe alla sottostima o sovrastima di un determinato antigene presente all'interno di esso. Un altro importante aspetto da considerare è il contributo del diluente. Come già accennato infatti, esso viene dispensato sulla striscia reattiva attraverso l'uso di un flacone. Ogni goccia rilasciata contiene mediamente un volume di circa $30 \mu\text{L}$ di soluzione, dunque l'aggiunta di una goccia in più o in meno rispetto a quelle richieste per lo svolgimento del test avrebbe come diretta conseguenza l'ottenimento rispettivamente di un campione troppo diluito o poco diluito. In particolare, la presenza di un eccessivo volume di diluente potrebbe portare ad un allagamento della membrana in nitrocellulosa dal momento che il *sample pad*, essendo un materiale poroso, è caratterizzato da un volume di saturazione oltre il quale esso non è in grado di trattenere il fluido depositato. Nel caso di un volume di diluente più basso, potrebbe invece diminuire l'affinità fra antigene ed anticorpo e in più, il moto del campione all'interno della membrana reattiva diventerebbe più difficoltoso. Dunque, anche questa criticità dovrà essere tenuta sotto controllo nello sviluppo di una possibile configurazione dell'autotest. È comunque fondamentale sottolineare come ciascun autotest venga progettato in modo tale che siano tollerate delle oscillazioni in termini di volumi di fluidi e di rapporti di diluizioni. Nonostante ciò, è utile cercare di minimizzare il più possibile l'insorgenza di errori per garantire all'utente un risultato attendibile ed ottenibile in maniera semplice ed intuitiva, pur considerando i vincoli legati ai costi di materiali e alla tipologia di produzione.

1.3 Requisiti di Progetto

Considerando quanto detto finora, è fondamentale lo sviluppo di una o più nuove configurazioni che possano migliorare gli aspetti critici dell'attuale test, senza però andare ad incrementare eccessivamente i costi di produzione, indurre modifiche nel processo di produzione, aumentare numerosità dei componenti e complessità di utilizzo dell'intero kit.

Dunque, i requisiti di progetto individuati per questo progetto possono essere riassunti attraverso il seguente elenco:

- Eliminare la presenza della micro-pipetta dal kit e sostituirla con un componente caratterizzato da un migliore funzionamento;
- Introdurre un meccanismo passivo di controllo di volume, requisito fondamentale per il campione biologico da analizzare e, se possibile, da individuare anche per il diluente;
- Individuare una configurazione brevettabile o compatibile con il rilascio di un modello di utilità;
- Mantenere lo stampaggio ad iniezione come processo per la produzione dei componenti plastici;
- Mantenere il più possibile invariato il processo di produzione e assemblaggio;
- Mantenere i costi il più possibile contenuti;
- Garantire la realizzazione di una configurazione sicura per l'operatore e di semplice utilizzo;
- Il risultato del test deve essere visibile in una finestra di tempo compresa fra i 5 e i 10 minuti, garantendo nel complesso una configurazione che permetta di svolgere il test in tempi brevi;
- Individuare una configurazione che non incida negativamente su specificità, sensibilità e accuratezza di ciascun test.

Alcuni di questi requisiti sono in contrasto fra di loro, come ad esempio il miglioramento delle caratteristiche del test accompagnato da un mantenimento dei costi e della semplicità di utilizzo. Dunque, le configurazioni sperimentate dovranno costituire una giusta via di mezzo fra tutti i requisiti di progetto precedentemente elencati. Per quanto riguarda il requisito della brevettabilità, esso è stato considerato non solo per proteggere la nuova configurazione da un punto di vista produttivo e commerciale, ma anche per individuare un autotest che permetta all'azienda di distinguersi dai concorrenti presenti sul mercato.

1.4 Letteratura scientifica

Il primo passo per l'individuazione e la realizzazione di una configurazione in grado di soddisfare al meglio i requisiti di progetto è l'analisi della letteratura scientifica disponibile, in modo da individuare quelli che sono gli approcci all'avanguardia in questo determinato ambito.

1.4.1 Micro-fluidica e capillarità

L'ambito attualmente più sviluppato dal punto di vista della manipolazione di fluidi è sicuramente quello della micro-fluidica, ovvero una branca della fluidodinamica che ha come obiettivo quello di sviluppare circuiti fluidici caratterizzati da canali dotati di una dimensione nominale dell'ordine dei micrometri (Figura 12) (Olanrewaju, et al., 2018).

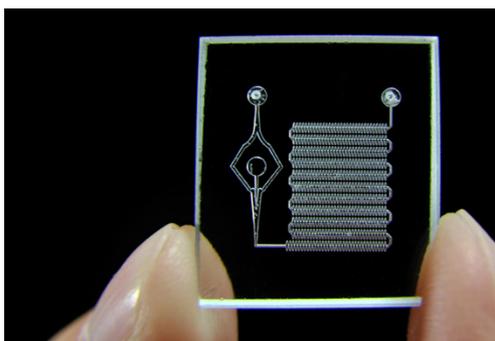


Figura 12: Immagine rappresentativa delle dimensioni di un circuito micro-fluidico.

Tali circuiti, realizzabili a costi molto bassi ed accoppiabili con dispositivi elettronici (Dong M, 2017), permettono di manipolare in maniera controllata ed efficiente un volume molto ridotto di fluidi e, a volta, in maniera completamente passiva. La principale particolarità di questi circuiti infatti è che, nonostante gli alti valori di resistenza idraulica determinati dalle piccole dimensioni dei canali, sono comunque garantite delle pressioni capillari molto elevate, le quali permettono di spostare fluidi semplicemente attraverso fenomeni passivi che si generano dall'interazione fra materiale e fluido. Nonostante ciò, alcuni di questi circuiti sono spesso accoppiati con sistemi in grado di generare una pressione costante o variabile nel tempo, come ad esempio le pompe siringhe o le pompe a vuoto (Smith, et al., 2016). Considerando il processo di produzione, tali circuiti vengono realizzati comunemente attraverso un processo conosciuto con il nome di *soft lithography*. Generalmente, si parte da uno stampo in *Poli-metil-metacrilato* (PMMA) realizzato attraverso prototipazione per stampa 3D o lavorazione

laser. Successivamente, il pezzo ottenuto viene utilizzato come negativo del circuito che si vuole realmente ottenere attraverso un'operazione chiamata *spin coating*. Durante tale processo, un certo volume di *Poli-Dimetil-Silossano* (PDMS) viene depositato sul negativo di PMMA e dopo un certo periodo necessario alla polimerizzazione, è possibile estrarre il positivo del circuito progettato. Questa tipologia di circuiti è composta solitamente da più strati di materiale dello stesso tipo o di materiale differente. I metodi di produzione e le dimensioni dei dispositivi risultano essere tuttavia incompatibili con quelli che sono i requisiti di questo progetto. Se si decidesse di puntare su tecnologie di questo tipo infatti, non potrebbe essere mantenuto il processo di produzione per stampaggio ad iniezione e all'utente verrebbe fornita una configurazione difficile da maneggiare e caratterizzata da tempi di attesa molto elevati per la lettura del risultato. Nonostante ciò, in questi circuiti sono presenti alcune componenti idrauliche che permettono di bloccare in maniera efficiente volumi di fluido indipendentemente da quelle che sono le proprietà fisiche di quest'ultimo. Il metodo più efficiente per ottenere il blocco di un fluido è la realizzazione di valvole costituite da membrane deformabili (Weng, et al., 2011). In questo modo infatti, è possibile bloccare un fluido attraverso una vera e propria barriera fisica, la quale deve però essere successivamente sbloccata attraverso meccanismi di pressione richiedenti energia esterna al circuito. Inoltre, per realizzare una valvola di questo tipo, vengono progettate membrane con spessore molto ridotto, il cui valore può arrivare perfino a 15 μm . L'utilizzo di una valvola di questo tipo richiederebbe la realizzazione di un dispositivo a strati (Figura 13) e ciò introdurrebbe un aumento del numero di componenti, i quali dovrebbero essere molto probabilmente realizzati in materiale differente. Scegliendo un approccio di questo tipo dovrebbero essere realizzati due stampi differenti e ciò incrementerebbero notevolmente i costi. Inoltre, verrebbero introdotte molto probabilmente delle ulteriori operazioni che dovrebbe svolgere l'utilizzatore.

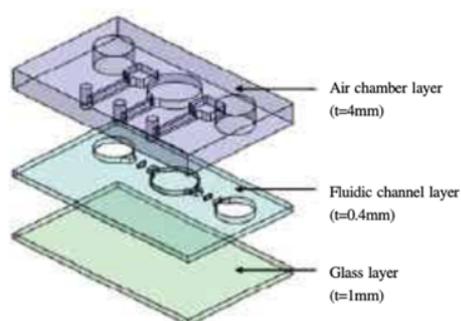


Figura 13: Immagine del circuito realizzato da Wang et al., il quale è caratterizzato dalla presenza di tre strati in materiale differente.

Tuttavia, esistono altri metodi in grado di bloccare un fluido in uno specifico punto e che potrebbero rivelarsi efficienti in un'applicazione di questo tipo. In particolare, si può fare riferimento al concetto di valvola capillare (Olanrewaju, et al., 2018). In questo caso, vengono sfruttati dei cambi di proprietà del circuito, i quali si basano solitamente su dei cambi di geometria o su dei cambi di materiale e proprietà superficiali (Zimmermann, et al., 2008).

Un'applicazione di questo genere si rivela dunque interessante per la configurazione richiesta, dal momento che potrebbe essere prelevato uno specifico volume di campione attraverso un fenomeno completamente passivo e che può essere incorporato all'interno di un sistema più complesso. Quest'ultima caratteristica permetterebbe infatti di ridurre il numero di componenti forniti all'utente inserendo la valvola capillare all'interno di strumenti già presenti nel kit, come ad esempio la cassetta contenente la striscia test o il flacone utilizzato per dispensare il diluente.

1.4.2 La valvola capillare

Come già anticipato, l'inserimento di questo componente all'interno di un circuito permette il blocco in maniera passiva di un determinato fluido dalle caratteristiche note. Esistono in particolare due metodi con cui una valvola capillare può essere realizzata:

- **Cambio di materiale** (Hitzbleck, et al., 2012): in questo specifico caso, il blocco del fluido è ottenuto inserendo in una specifica zona del circuito un materiale differente rispetto a quello utilizzato per realizzare i canali a monte di tale punto. Inserendo ad esempio un materiale idrofobico, il cambio delle proprietà di superficie induce una variazione di angolo di contatto del liquido con quest'ultima, garantendone quindi il blocco (Figura 14).

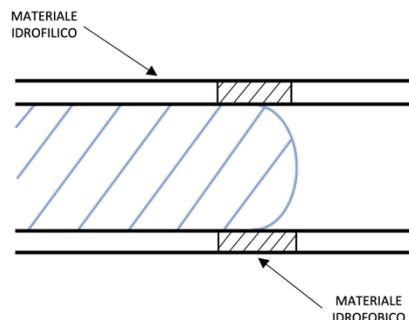


Figura 14: Schema di funzionamento della valvola capillare ottenibile attraverso un cambio di materiale.

Questa soluzione, nel caso in cui il materiale idrofobico fosse un polimero deformabile come ad esempio il PDMS, renderebbe possibile lo sblocco della valvola capillare attraverso l'applicazione di una pressione su di esso. In altre parole, una valvola di questo tipo potrebbe essere utilizzata come tasto. Nonostante questa soluzione risulti essere efficiente, in termini di produzione significherebbe introdurre un ulteriore componente che dovrebbe essere realizzato con uno stampo apposito e che dovrebbe essere successivamente assemblato sul kit. Inoltre, essendo un meccanismo sbloccabile attraverso l'applicazione di una pressione esterna, aumenterebbe sia il numero di operazioni che l'utente deve svolgere, sia la probabilità di errore nello svolgimento del test. Per questo motivo, una soluzione basata su questo approccio deve essere scartata per rispettare i requisiti di progetto;

- **Cambio di sezione** (Sugioka, et al., 2014): in questo caso, il blocco del fluido è ottenibile attraverso un brusco cambio di sezione all'interno del canale in cui esso sta scorrendo (Figura 15).

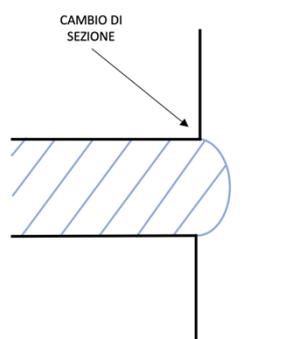


Figura 15: Schema di funzionamento della valvola capillare ottenibile attraverso un cambio di sezione garantito dall'incrocio fra due canali perpendicolari.

Nello specifico, esistono due diverse tipologie di valvole capillari di questo tipo: valvole a un livello e a due livelli. In entrambi i casi, il concetto su cui si basa questo componente è la creazione di una pressione localizzata che permetta di contrastare la pressione sfruttata dal fluido per scorrere all'interno di un canale. Dimensionando opportunamente questo aspetto, sarebbe dunque possibile ottenere il blocco del liquido di interesse in corrispondenza di un punto desiderato. Facendo riferimento alla valvola ad un livello, essa è realizzabile introducendo semplicemente un cambio di sezione garantito dall'aumento di larghezza del canale, mentre considerando quelle a due livelli il cambio di sezione coinvolge sia un aumento della larghezza che dello spessore del canale. Entrambe le configurazioni si rivelerebbero dunque utili per la realizzazione di un dispositivo integrabile nel kit già esistente.

Considerando quanto detto finora, una valvola capillare realizzata con un cambio di sezione opportunamente dimensionato garantirebbe un meccanismo di controllo di volume di sangue in maniera completamente passiva. Tuttavia, è comunque necessario introdurre un elemento che permetta successivamente di sbloccare la valvola, permettendo la migrazione del campione verso la striscia reattiva. In questa specifica applicazione, la valvola capillare potrebbe essere ad esempio sbloccata sfruttando l'interazione del sangue con la soluzione diluente come mostrato nella figura seguente (Figura 16). Il contatto con tale soluzione infatti garantirebbe il movimento del sangue sia grazie ad un cambio delle proprietà di bagnabilità in corrispondenza della valvola, sia grazie agli sforzi di taglio indotti dal flusso della soluzione diluente nel punto in cui il menisco di fluido risulta bloccato.

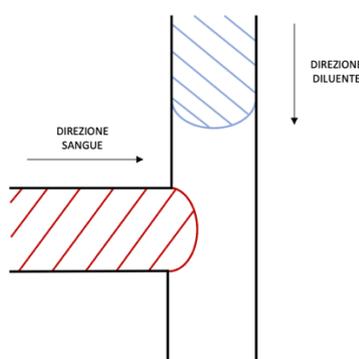


Figura 16: Schema generale del meccanismo di blocco e successivo sblocco della valvola capillare. Questo principio è valido per entrambe le tipologie di valvole basate su un cambio di sezione.

1.4.3 Dimensionamento di una valvola capillare ad un livello

La principale formula utilizzata per dimensionare una valvola capillare è la seguente (Equazione 1) e permette nello specifico di determinare la caduta di pressione indotta dalla presenza di un cambio di sezione:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{h} \left(\frac{\cos \theta - \frac{\alpha \sin \beta}{\sin \alpha}}{\cos \beta + \frac{\sin \beta}{\sin \alpha} \left(\frac{\alpha}{\sin \alpha} - \cos \alpha \right)} \right)$$

Equazione 1: Formula utilizzata per determinare la pressione indotta dalla valvola capillare in funzione di parametri geometrici e fisici appartenenti al fluido e al circuito.

I principali parametri considerati all'interno della formula sono i seguenti e fanno riferimento in particolare alla presenza di un canale con geometria rettangolare:

- γ = Tensione superficiale fra fluido ed aria [N/m];
- h = spessore del canale rettangolare a monte della valvola [m];
- θ = angolo di contatto del fluido con la superficie del canale;
- α = angolo formato dal menisco di fluido all'imboccatura della valvola;
- β = angolo del cambio di sezione;

Tuttavia, questa formula viene spesso sostituita da una più semplice e che è stata dimostrata essere sperimentalmente attendibile (Equazione 2). In questo caso particolare viene tralasciato il valore dell'angolo assunto dal menisco di fluido all'imbocco della valvola, dal momento che tale parametro non dipende solo dal fluido e dal materiale ma anche dalle dimensioni del canale. Con la seguente formula è infatti possibile individuare l'angolo minimo richiesto dal cambio di sezione per riuscire a bloccare efficacemente il fluido ed essa tiene solamente conto di quelle che sono le sue proprietà in termini di angolo di contatto con la superficie (Anon., 2017):

$$\beta \geq \frac{\pi}{2} - \theta$$

Equazione 2: Formula che permette di determinare il minimo angolo di contatto richiesto per creare una valvola capillare ad un livello.

Questa formula risulta essere particolarmente utile, dal momento che, a patto di conoscere l'angolo di contatto del liquido con il materiale, è possibile dimensionare la valvola capillare in maniera semplice. Lo schema della valvola capillare ad un livello può essere dunque riassunto attraverso il seguente schema (Figura 17).

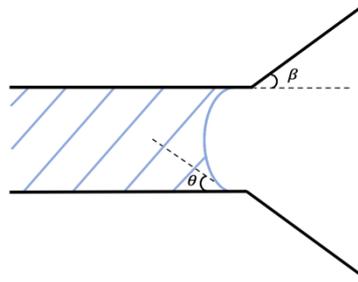


Figura 17: Schema generale della struttura di una valvola capillare ad un livello, dove il cambio di sezione è garantito da una sezione divergente con un minimo angolo pari a β .

1.4.4 Dimensionamento di una valvola capillare a due livelli

Considerando ora una valvola capillare a due livelli, essendo un elemento circuitale più complesso rispetto al componente descritto in precedenza, necessita di essere progettato tenendo conto di un numero maggiore di parametri. In letteratura scientifica non è presente un'equazione compatta come quelle descritte nella precedente sezione e che sia in grado di descrivere in maniera esaustiva una valvola capillare di questo tipo. Tuttavia, in letteratura sono suggeriti diversi parametri da considerare per caratterizzare una valvola capillare a due livelli. In particolare, la struttura di un componente di questo tipo può essere schematizzata come segue (Figura 18).

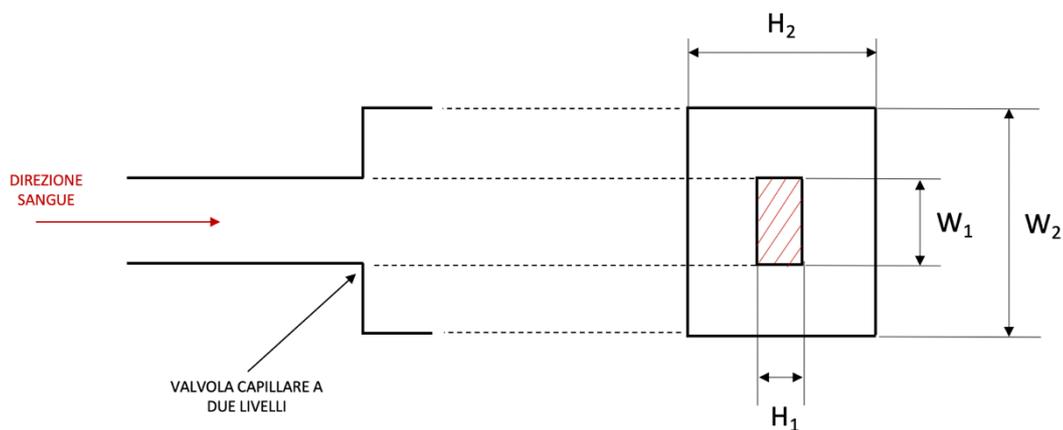


Figura 18: Rappresentazione a due viste della valvola capillare a due livelli, in cui è possibile come l'aumento di sezione sia dovuto sia ad un aumento di spessore che ad un aumento di larghezza.

Facendo riferimento al canale con sezione rettangolare descritto nella precedente immagine, uno dei parametri di primaria importanza è quello indicato con il nome di *aspect ratio*, ovvero il rapporto numerico fra lo spessore e la larghezza del canale posizionato a monte della valvola capillare. Facendo riferimento all'immagine precedente, *l'aspect ratio* trattato in questa sperimentazione fa riferimento al rapporto fra i valori di H_1 e W_1 . In particolare, è stato dimostrato come sia necessario considerare dei canali caratterizzati da un rapporto fra queste due grandezze che sia minore di 1 (Leu & Chang, 2004) per poter ottenere un efficiente blocco del liquido, condizione che sembra migliorare più ci si avvicini dal valore limite appena citato (Grafico 1). In questa condizione infatti, quello che si verifica è che l'area della sezione idraulica diminuisce fino a raggiungere il suo minimo valore, condizione che permette di ridurre l'energia superficiale presente in questo punto. Ovviamente, quest'ultima considerazione è valida a parità di dimensione del canale situato a valle della valvola, ovvero a parità di valori H_2 e W_2 .

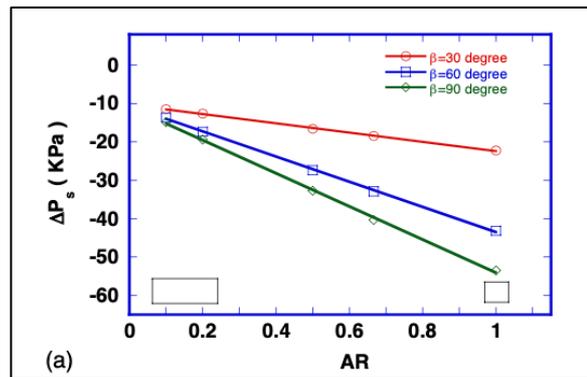


Grafico 1: Grafico realizzato da *Leu et al.* che descrive la caduta di pressione di una valvola capillare in funzione dell'*aspect ratio* e dell'angolo imposto per indurre il cambio di sezione.

Osservando il grafico precedente, è possibile notare come anche in questo caso venga considerato tra i parametri di interesse l'angolo di cambio di sezione ed in particolare, è evidente come un angolo pari a 90° risulti essere il più efficiente per i fini proposti. Questo aspetto è ulteriormente confermato da alcuni studi che dimostrano come la pressione capillare in corrispondenza della valvola possa essere determinata attraverso la seguente equazione (Equazione 3):

$$\Delta P = \frac{\gamma(w + h)}{wh} \cos(\theta + \beta)$$

Equazione 3: Equazione che descrive la pressione capillare in un canale rettangolare in seguito ad un cambio di sezione imposto dall'angolo β .

Nel caso in cui si avesse un angolo $\beta=90^\circ$ si avrebbe quindi un cambio di fase della pressione capillare, la quale risulterebbe uguale e contraria a quella che viene utilizzata per riempire il canale di interesse. Tuttavia, esiste un ulteriore parametro da considerare in questo caso, ovvero la differenza di altezza fra il canale a monte e a valle della valvola capillare. In particolare, i documenti a disposizione fanno riferimento ad un parametro definito con il nome di ΔH , ovvero la emi-differenza tra i valori di H_2 e H_1 . I dati presenti nella letteratura disponibile mostrano come, all'aumentare di questo valore, la valvola capillare risulti essere più efficiente ed affidabile (Olanrewaju, et al., 2018), risultato che può essere considerato ragionevole dal momento che la caduta di pressione all'interno di un canale è proporzionale all'aumento della sezione di quest'ultimo. Di seguito, sono mostrate delle curve di successo che descrivono i risultati ottenuti da *Olanrewaju et al.* e che sono considerate significative ai fini della trattazione (Grafico 2).

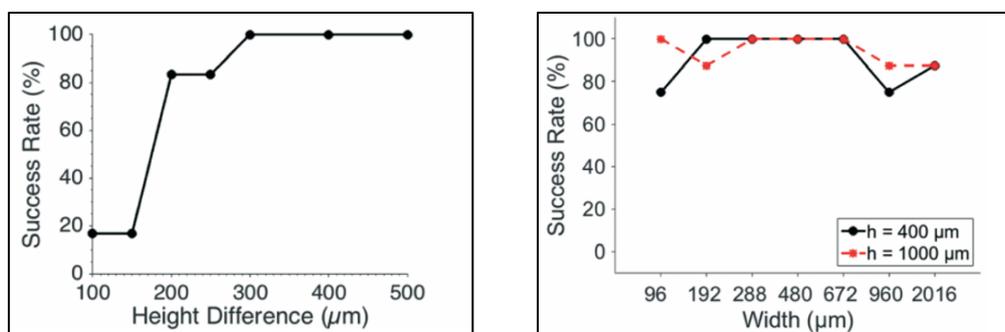


Grafico 2: Grafici che mostrano curve di successo relative alla tenuta della valvola capillare in funzione della differenza di altezza dei canali a cavallo della valvola e in funzione delle dimensioni del canale rettangolare.

Infine, è opportuno ricordare che nel caso di una valvola capillare a due livelli, l'aumento di sezione generato da un aumento della larghezza del canale è considerato un parametro non rilevante per la progettazione di tale elemento. Gli articoli di letteratura scientifica appena citati fanno comunque riferimento ad esperimenti in cui il liquido utilizzato risulta essere molto limitato in termini di volume. Il massimo volume sperimentato in queste configurazioni si aggira infatti attorno ad un valore di 2 µL. Per questo motivo, nella trattazione che segue è di particolare interesse andare a valutare l'efficienza della valvola capillare anche in funzione del volume di fluido che essa deve trattenere.

1.4.5 Modelli analitici di capillarità

Una volta individuati i corretti modelli per dimensionare una valvola capillare, occorre ora trovare uno o più modelli che permettano di descrivere il moto per capillarità di un fluido all'interno di un canale. Questa ricerca è utile per due principali motivi: da un lato permetterebbe di capire con che velocità si riempirà il canale all'interno del quale il sangue verrà accumulato, dall'altro lato permetterebbe anche di determinare la portata e le pressioni agenti su di esso dipendenti sia dalle dimensioni del condotto che dal suo orientamento nello spazio. Il modello più completo in questo caso è quello di *Lucas-Washburn* (Anon., 2008), il quale si basa sul bilancio di forze che agiscono su un determinato volume di fluido. In particolare, il modello precedentemente citato assume la seguente espressione in termini di bilancio di forze:

$$F_{CAP} - F_{IN} - F_{VISC} \pm F_{GRAV} - F_{ARIA} = 0$$

Equazione 4: Equazione relativa al bilancio di forze agenti su un volume di fluido che scorre in un canale.

Analizzando l'equazione, è possibile notare come essa si basi sul bilancio di forze agenti su un volume di liquido. Nello specifico, la pressione capillare è contrastata rispettivamente dalle forze di inerzia, la forza di attrito viscoso interna al fluido e agente sulle pareti del condotto, la forza di gravità e la forza indotta dall'eventuale presenza di aria all'interno di un canale chiuso all'atmosfera. Nello specifico caso trattato, si può ipotizzare di voler trascurare le forze inerziali, dal momento che si stanno considerando masse molto piccole, e di trascurare anche il contributo della pressione dell'aria, dal momento che non si stanno dimensionando canali chiusi all'atmosfera. Considerando infine la forza di gravità, essa è stata mantenuta nell'equazione di bilancio nonostante i piccoli volumi di fluido considerati. Inoltre, il contributo di tale forza verrà accompagnato da segno positivo o negativo a seconda che il canale venga riempito rispettivamente dal basso o dall'alto.

Individuati i modelli necessari, prima di procedere alla progettazione è necessario effettuare una ricerca brevettuale per poter valutare se la configurazione ipotizzata può essere sperimentata e successivamente prodotta.

1.5 Ricerca Brevettuale

La valvola capillare è un meccanismo noto dalla letteratura e che viene ampiamente utilizzato per bloccare un fluido in un punto desiderato del circuito. Come già detto in precedenza però, è nell'interesse del progetto andare a verificare se una configurazione di questo tipo sia già stata utilizzata come meccanismo di controllo di volume passivo di un liquido. Nel caso in cui una configurazione di questo tipo non dovesse risultare protetta, potrebbe essere dunque liberamente utilizzata e ad essa potrebbe essere associato un modello di utilità poiché non è una soluzione tecnica del tutto nuova allo stato della tecnica.

1.5.1 Parole chiave e classificazione dei brevetti

La ricerca brevettuale è stata impostata su due database di ricerca, ovvero *Google Patents* ed *Espacenet*. In entrambi i casi, sono state utilizzate le 10 parole chiave riportate qui di seguito (Tabella 1):

PAROLE CHIAVE UTILIZZATE	
LATERAL FLOW	CARTRIDGE
IMMUNOASSAY	MICROFLUIDIC CHIP
CAPILLARY STOP VALVE	RAPID TEST
VOLUME CONTROL	PASSIVE FLOW
BODY FLUID	INTERIOR CHANNEL

Tabella 1: Parole chiave utilizzate per la ricerca brevettuale.

Considerando la precedente tabella, si è cercato di individuare all'interno della letteratura brevettuale un meccanismo di controllo di volume ottenuto attraverso l'uso di una valvola capillare, facendo specificatamente riferimento all'ambito di applicazione in questione ma rimanendo comunque generici su quello che è il campione da prelevare. In caso contrario infatti, il rischio sarebbe quello di vincolarsi ad un singolo fluido biologico, come ad esempio il sangue, individuando di conseguenza un brevetto legato solo a questo campione e tralasciando tutte le altre informazioni disponibili. Il risultato della ricerca brevettuale così impostata ha portato all'individuazione di 93 brevetti totali, i quali sono stati poi suddivisi in funzione delle loro caratteristiche secondo lo schema riportato successivamente (Tabella 2).

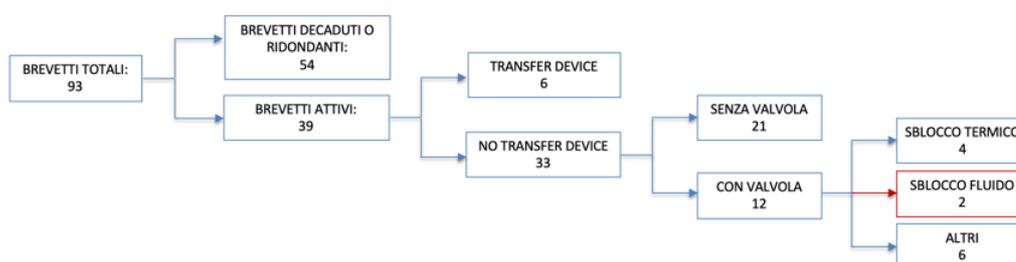


Tabella 2: Schema riassuntivo del processo con cui sono stati suddivisi i brevetti individuati in letteratura.

Per prima cosa, non sono stati considerati ovviamente i brevetti scaduti e quelli ridondanti, ovvero brevetti uguali fra loro ma che sono stati depositati in stati differenti e con lingue differenti. Questa operazione ha permesso di ridurre notevolmente il numero di brevetti da analizzare, i quali sono risultati essere pari a 39. Successivamente, sono stati eliminati i brevetti che presentavano l'utilizzo di *transfer device*, ovvero dispositivi simili alla micropipetta capillare che vengono utilizzati per prelevare il campione e successivamente depositarlo su un altro componente della configurazione. Dopodiché, i brevetti rimasti sono stati differenziati in base alla presenza o all'assenza di una valvola capillare nella configurazione, restituendo come risultato la presenza di 12 brevetti che fanno esplicitamente riferimento ad una valvola capillare. Tuttavia, nessuno di questi utilizza la valvola come meccanismo di controllo di volume ma solamente come elemento in grado di bloccare un generico fluido. Questo risultato permette di dimostrare la possibilità di realizzare una configurazione che prevede l'utilizzo della valvola capillare come meccanismo di controllo di volume. Compiendo un'ulteriore analisi, è stato possibile individuare come solamente in due brevetti viene poi utilizzato un secondo fluido come meccanismo per sbloccare la valvola. Considerando più nel dettaglio gli ultimi due brevetti individuati, è possibile notare come nel caso del brevetto CA2849900A1 la valvola sia ottenuta attraverso la funzionalizzazione della superficie con un surfactante idrofobico, il quale viene poi rimosso dal passaggio di un solvente, mentre nel caso del brevetto US8105849 si ha una valvola capillare sbloccata da un fluido che passa nello stesso canale in cui il primo fluido è stato bloccato (Figura 19).

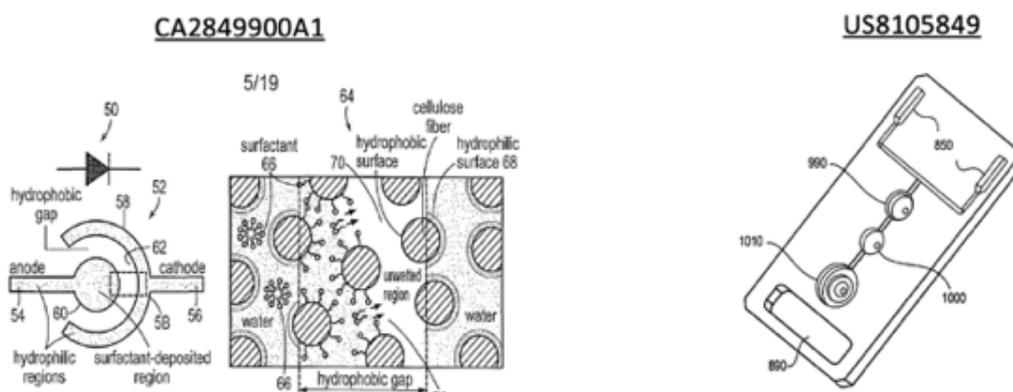


Figura 19: Immagine che rappresenta i due principali brevetti isolati durante la ricerca brevettuale.

1.5.2 Meccanismo di controllo del diluente

Infine, è interessante sottolineare come la ricerca brevettuale abbia comunque permesso di identificare dei meccanismi con cui controllare anche il volume di diluente. Per questo specifico fluido si è deciso di scartare l'ipotesi della presenza di una valvola capillare dal momento che in questo caso sarebbe fondamentale l'utilizzo di un elemento esterno al circuito per garantire un'interazione fra quest'ultimo e il sangue. Dunque, in questa specifica situazione, si potrebbe fare affidamento a due meccanismi differenti, entrambi che fanno riferimento a due brevetti scaduti (Figura 16). Considerando il brevetto US6261519B1, questa configurazione presenta l'utilizzo di una seconda valvola capillare per bloccare due elementi miscelati fra loro, il tutto accoppiato dalla presenza di un *réservoir* di drenaggio che permette di accumulare al suo interno il liquido in eccesso. Nel caso invece del brevetto US5935864A, il diluente viene inserito all'interno di un flacone termosaldato, il che permetterebbe di inserire un volume predefinito di diluente all'interno di una struttura isolata, la quale renderebbe completamente trascurabili le oscillazioni di volume dovuti ad eventuale evaporazione.

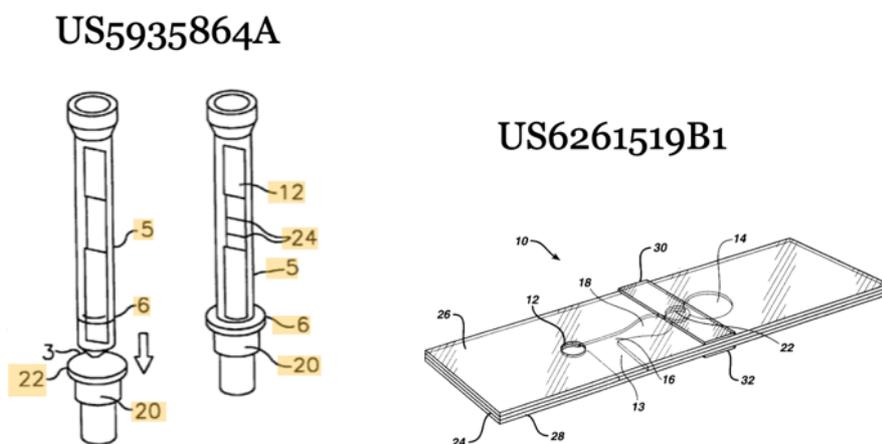


Figura 20: Schemi dei brevetti decaduti ed ipotizzati idonei per il controllo del volume di diluente.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Processo di prototipazione

Dal momento che la realizzazione di uno stampo utilizzabile in un processo di stampaggio per iniezione o di uno stampo pilota in silicone costituirebbe un investimento molto costoso per iniziare, è necessario per prima cosa trovare un metodo di prototipazione che permetta di ottenere dei campioni utilizzabili per la sperimentazione. Sempre per una questione di costi e tempistiche, si è preferito evitare di utilizzare processi di prototipazione basati sull'utilizzo di macchine utensili. Il processo scelto in questo caso è la stampa 3D per Stereolitografia, ovvero una tipologia di lavorazione che induce la polimerizzazione a strati di materiali polimerici fotosensibili. Tali polimeri, inizialmente in forma liquida, solidificano in seguito alla loro stimolazione ottenuta attraverso un fascio laser opportunamente indirizzato da un sistema di specchi ottici (Figura 21).

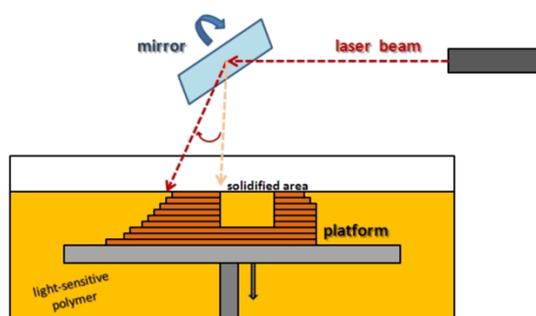


Figura 21: Schema rappresentativo del processo di Stereolitografia.

L'utilizzo di questa specifica tecnologia permette di ottenere i dispositivi che si vuole sperimentare in tempi relativamente brevi e a fronte di costi contenuti. Tuttavia, questo approccio non permette di sperimentare le configurazioni progettate sui materiali che potrebbero essere utilizzati sul prodotto finito, ma solamente sui materiali disponibili per questo processo di prototipazione e che saranno descritti in seguito.

2.1.1 Tecnologia SLA e resina foto-polimerizzante

La stampante utilizzata in questo caso è la *Form 2* (Figura 22), prodotto realizzato dalla *FormLabs*, che sfrutta appunto come processo di lavorazione la Stereolitografia.



Figura 22: Immagine della stampante Form 2.

Questa stampante è un macchinario professionale utilizzato ampiamente in ambito industriale e che permette di garantire prototipi stampati in breve tempo, accompagnati da alta precisione e accuratezza. In particolare, la resina utilizzata in questo caso è conosciuta commercialmente con il nome di *Resin Clear*, la quale è stata scelta in funzione delle sue caratteristiche di trasparenza e la cui composizione, è riportata qui di seguito:

- Monomero di metacrilato al 25-50%;
- Oligomeri di metacrilato al 75-95%;
- Difenil - (2,4,6-trimetilbenzoin) - fosfinossido all'1%.

Considerando i parametri di prototipazione, si è deciso di sezionare ogni pezzo attraverso un opportuno software di *slicing* dedicato con piani dello spessore di 100 μm , depositati con una velocità di stampa di 5 mm/h in direzione verticale e una potenza polimerizzante di 15 J/mm². Successivamente a questo processo di lavorazione, ogni pezzo richiede un trattamento di lavaggio attraverso una soluzione acquosa di alcool isopropilico in modo da eliminare i residui di resina presenti nelle cavità durante un processo di lavaggio. Infine, i prototipi stampati

richiedono un processo di post lavorazione all'interno di una camera contenente led UV con lunghezza d'onda pari a 405 nm. Questo ultimo processo si rende necessario poiché per prima cosa è possibile asciugare in maniera ottimale i pezzi stampati lungo tutte le loro superfici ed infine, garantisce che le zone più interne dell'oggetto siano caratterizzate anch'esse da una polimerizzazione completa. Se ciò non avvenisse infatti, i prototipi sarebbero caratterizzati da discontinuità meccaniche che, nel caso peggiore, potrebbero portare alla formazione di crepe e fratture all'interno di ogni oggetto. Per portare a termine questa operazione, è stato utilizzato il dispositivo riportato qui sotto (Figura 23), dotato di 4 lampade UV da 9W ciascuna.



Figura 23: Immagine relativa al forno UV utilizzato per la fase finale di post-lavorazione dei dispositivi stampati in 3D.

Dal punto di vista del funzionamento, la macchina è in grado di garantire una buona qualità di stampa a patto di rispettare determinati requisiti. Per prima cosa, nel caso della presenza di canali vuoti all'interno del pezzo, essi dovranno presentare una minima dimensione di $800\ \mu\text{m}$ per evitare che la resina, in fase di polimerizzazione, si accumuli all'interno di tali canali andando di conseguenza ad otturarli. Infatti, il fascio laser utilizzato per far polimerizzare il materiale, nonostante sia estremamente focalizzato, è comunque caratterizzato da che portano alla polimerizzazione di zone indesiderate, seppur molto piccole. Dopodiché, per poter garantire un'adeguata stabilità dimensionale, le pareti dell'oggetto dovranno presentare uno spessore di almeno $500\ \mu\text{m}$. In caso contrario, non solo verrebbe prodotto un oggetto con scarse proprietà meccaniche, ma si potrebbe anche verificare un collasso delle pareti in fase di stampa, restituendo degli oggetti con una geometria ed una forma anomali. Per concludere, nel caso di elementi accoppiati, si rende necessario disegnare albero e foro con una differenza di dimensione nominale pari ad almeno $200\ \mu\text{m}$ per simulare in maniera corretta il loro incastro. Questo accorgimento deve essere preso in funzione di quella che è l'incertezza di una lavorazione di questo tipo. Tutti questi parametri sono vincoli che saranno tenuti in considerazione nella fase di progettazione, in modo da poter ottenere dei prototipi effettivamente utilizzabili.

2.1.2 Validazione processo di prototipazione

Per valutare l'efficienza della lavorazione e la sua idoneità alla sperimentazione in atto, verranno compiute delle analisi delle proprietà superficiali dei pezzi stampati. In particolare, verranno effettuate delle analisi di rugosità della superficie degli oggetti stampati. Questa analisi permette di determinare differenti parametri utili alla sperimentazione. Nello specifico, i dati ricavati verranno utilizzati per determinare sia se il processo di prototipazione utilizzato è in grado di indurre delle modifiche di bagnabilità della superficie, sia per determinare lo scostamento della morfologia superficiale da quella ottenibile per stampaggio ad iniezione. L'analisi superficiale sarà svolta attraverso l'utilizzo di un microscopio ottico (Figura 24).



Figura 24: Immagine del microscopio ottico utilizzato per le analisi di rugosità superficiale.

Successivamente, saranno svolte delle analisi di bagnabilità valutando l'angolo di contatto assunto dal sangue trattato con sostanze chelanti (nello specifico, EDTA) e dalle soluzioni diluenti utilizzate rispetto alla superficie del pezzo stampato. Le immagini relative agli angoli di contatto sono state ricavate attraverso l'utilizzo della fotocamera di uno *smartphone*, tenuta in posizione da un opportuno sostegno stampato in 3D con tecnica FDM e realizzato in PLA. Tale sistema si rende indispensabile per poter rendere riproducibili e confrontabili le foto scattate. Il protocollo sperimentale seguito in questa fase prevede la deposizione di gocce di sangue o diluente con un volume pari a 10 μ L sulla superficie di lastre stampate con tecnologia SLA. Sono state prodotte in questa fase 3 differenti lastre con superficie di 20mm x 20mm ed uno spessore di 5mm. Per ognuna delle lastre, sono state considerate le proprietà di bagnabilità delle due superfici con area maggiore, sulle quali sono state depositate due gocce del liquido di interesse. Per ogni goccia infine, sono stati considerati sia l'angolo di contatto destro che l'angolo di contatto sinistro come mostrato nella figura seguente (Figura 25).



Figura 25: Immagine che rappresenta due gocce di sangue depositate su lastre stampate in SLA. L'immagine mostra gli angoli di contatto valutati e l'ottenimento del valore numerico attraverso software *Matlab*.

Dunque, indipendentemente dal fluido utilizzato, sono stati ricavati 24 valori angolo di contatto, i quali sono stati successivamente importati su *Excel* in modo tale da valutare il valore medio e la deviazione standard. L'individuazione dell'angolo di contatto è stata ottenuta attraverso uno script *Matlab* riportato qui di seguito (Figura 26).

```

clc
clear all

format short

%Importazione e visualizzazione immagine

I = imread('Sangue_8.jpeg');
imshow(I)

%Vettore contenente i 4 angoli di contatto presenti in ogni immagine

a = zeros(4,1);

for i=1:4
    h = msgbox('Draw Line');
    waitfor(h)

    %Creazione di una retta passante per due punti

    hline = drawline;
    p = hline.getPosition;
    x = p(:,1);
    y = p(:,2);

    %Stima del valore della pendenza della retta creata

    a(i) = atand(diff(y)/diff(x));

    %Output valore numerico dell'angolo di contatto individuato

    h = msgbox( sprintf('Angle: %2.2f degrees',a(i)) );
    waitfor(h)
end

```

Figura 26: Script *Matlab* utilizzato per la stima dell'angolo di contatto.

Considerando il codice precedente, è possibile notare come, una volta caricata l'immagine in ambiente *Matlab*, sia possibile disegnare manualmente delle rette sull'immagine. La pendenza di queste rette viene ricavata poi automaticamente dal codice e successivamente il valore viene utilizzato per l'analisi statistica.

2.1.3 Equazioni

Considerando il modello per il dimensionamento capillare, l'equazione utilizzata è quella di Lucas-Washburn, la quale è stata opportunamente derivata e risolta analiticamente rispetto ad una geometria cilindrica e rettangolare (Equazione 5).

$$4\gamma \cos(\theta)\pi R - 8\pi\mu h \frac{dh}{dt} - \pi R^2 \rho g \sin(\alpha) = 0$$

$$\underbrace{4\gamma \cos(\theta) (w + s)}_{\text{FORZA CAPILLARE}} - \underbrace{\frac{24(w + s)\mu}{h} h \frac{dh}{dt}}_{\text{FORZA D'ATTRITO VISCOSO}} - \underbrace{\rho w s g \sin(\alpha) h}_{\text{FORZA PESO}} = 0$$

Equazione 5: Equazioni differenziali relative al bilancio di forze agenti sul volume di fluido nel caso di geometria rettangolare e cilindrica.

Nelle equazioni precedenti, i parametri considerati sono:

- γ = tensione superficiale del fluido con l'aria [N/m];
- μ = viscosità del fluido [Pa · s];
- h = posizione del fronte di fluido nel tempo [m];
- ρ = densità del fluido [Kg/m³];
- g = costante di gravità [m/s²];
- α = angolo di inclinazione del canale;
- w = larghezza del canale rettangolare [m];
- s = spessore del canale rettangolare [m];
- R = raggio del canale circolare [m];

La risoluzione delle precedenti equazioni porta all'individuazione di equazioni analitiche in grado di mettere in relazione la posizione del fronte di fluido nel tempo con le caratteristiche fisiche del fluido e le proprietà geometriche del canale in cui esso scorre. In particolare, le equazioni precedenti fanno riferimento alle seguenti configurazioni geometriche (Figura 27).

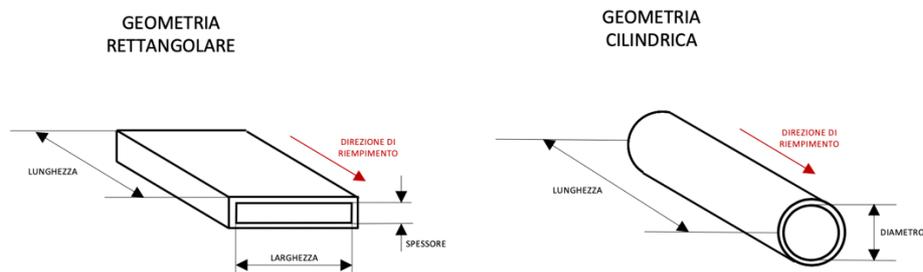


Figura 27: Schemi geometrici delle configurazioni considerate nei modelli analitici di riempimento dei canali.

Le equazioni ottenute sono state poi rimaneggiate in modo da ottenere funzioni che permettono di individuare il tempo di riempimento di un canale capillare nelle suddette condizioni. Tali equazioni permettono inoltre di determinare quali sono le dimensioni minime in grado di garantire il riempimento effettivo di un canale e sufficiente pressione capillare per ottenere tale risultato. Anche queste equazioni sono state poi implementate nell'ambiente *Matlab* in modo da ottenere dei grafici mono e bi-dimensionali per valutare le grandezze di interesse, principalmente in funzione delle caratteristiche geometriche del circuito in esame. I due script utilizzati in questo caso sono riportati nell'appendice inserito alla fine del documento.

2.2 Sperimentazione in laboratorio

Una volta ottenuti i prototipi, è possibile impostare la sperimentazione vera a propria. Nello specifico, verrà utilizzato sangue umano, trattato con EDTA, sia per le prove preliminari atte a valutare la tenuta della valvola, sia per le prove di funzionalità dei dispositivi. All'interno degli esperimenti saranno utilizzate soluzioni diluenti specifiche per la tipologia di test in esame e sarà poi valutata la compatibilità della configurazione individuata con le strisce reattive attualmente utilizzate. Si è deciso di utilizzare sangue umano in modo tale da tenere conto il più possibile delle problematiche legate alla matrice biologica utilizzata, come ad esempio la viscosità e la presenza di cross-interferenti.

2.2.1 Validazione dimensionamento valvola capillare

Per valutare in particolare la tenuta della valvola capillare, sono stati realizzati dei prototipi stampati in 3D, i quali permettono di sperimentare i principali parametri geometrici in gioco sia nel caso della valvola ad un livello che nel caso della valvola a due livelli. Facendo riferimento alla valvola a due livelli, si è deciso di realizzare una serie di prove con l'obiettivo di considerare all'interno della sperimentazione i 3 parametri considerati fondamentali per la realizzazione di tale componente, ovvero:

- Volume (variabile fra 10 μ L e 30 μ L);
- Aspect ratio (variabile fra 1 e 0,2);
- Differenza di altezza fra canale a monte e a valle della valvola capillare (variabile fra 500 μ m e 2500 μ m).

Lo scopo finale di questa fase di sperimentazione, compatibilmente con quanto potuto osservare nella letteratura scientifica, è quello di ricavare delle curve di percentuale di successo che diano la possibilità di evidenziare l'efficacia dei parametri precedentemente descritti. I precedenti parametri sono stati sperimentati secondo uno che può essere riassunto in maniera efficiente dalla seguente tabella (Tabella 3):

Valvola a due livelli con $\Delta H = 1000 \mu\text{m}$			
Aspect Ratio	Volume di sangue [μL]		
	10	20	30
0,34			
0,5			
1			

Tabella 3: Tabella rappresentativa della tipologia di sperimentazione avviata in questa fase in cui viene indagata la relazione fra *aspect ratio* e volume di sangue a parità di ΔH .

Per ognuna delle prove viste in precedenza, sono state effettuate delle prove in triplicato per poter ottenere dei valori di percentuale di successo. In ognuno di questi casi, la valvola capillare è stata considerata funzionante nel momento in cui, in seguito all'aggiunta di un volume di sangue in eccesso rispetto a quello che il canale può potenzialmente trattenere, tale volume viene mantenuto all'esterno del canale per almeno 1 minuto.

Nel caso della valvola capillare ad un livello invece, essendo solamente uno il parametro di interesse, si è deciso di effettuare per ogni cambio d'angolo 5 campioni, i quali sono stati considerati funzionanti attraverso la stessa modalità descritta in precedenza.

2.2.2 Protocollo di confronto e validazione

Per poter valutare l'effettiva funzionalità delle configurazioni sperimentate, si è deciso di applicarle in particolare a due test, ovvero quelli relativi al PSA (*Prostate-specific antigen*) e alla misurazione del valore totale di IgE. Si è deciso di valutare il funzionamento di questi due test dal momento che in entrambi i casi, seguendo degli opportuni standard e protocolli di riferimento, è possibile andare a inserire all'interno del sangue l'antigene di interesse in modo da ottenere dei campioni positivi con concentrazione nota. Il primo test viene utilizzato per identificare pazienti caratterizzati da ipertrofia della prostata, fattore fortemente correlato con il rischio di insorgenza di tumore a tale organo, mentre il secondo test permette di identificare soggetti caratterizzati da una possibile risposta allergica generica, senza dunque individuare nello specifico il fattore che ha generato tale risposta.

Una volta completata la prototipazione dei dispositivi e la realizzazione delle membrane reattive, la loro funzionalità verrà valutata attraverso un protocollo che tiene conto di quelli che sono considerati gli aspetti più critici relativi al funzionamento di un autotest diagnostico. Nello specifico, le modalità di valutazione funzionale possono essere riassunte attraverso il seguente protocollo:

- **Valutazione campioni positivi e negativi:** per ciascuna configurazione, si valuterà l'efficacia con cui essa è in grado di individuare sia i campioni positivi che i campioni negativi. Inoltre, le strisce reattive saranno sottoposte ad un'analisi mediante spettrometro, ovvero uno strumento in grado di andare a misurare l'intensità di colorazione della banda test e della banda di controllo in termini di mAbs. In questo modo, sarà possibile valutare sia il funzionamento globale di ciascuna configurazione che la visibilità delle bande, dal momento che l'intensità della loro colorazione è correlata alla concentrazione di antigene immobilizzata su di esse;
- **Emolisi:** è un parametro che verrà valutato visivamente. Nello specifico, la presenza dell'emolisi può essere individuata valutando se la componente in nitrocellulosa della striscia reattiva sia caratterizzata da una colorazione rosata nel caso di bassa emolisi o rossastra nel caso di alta emolisi. L'eventuale presenza di emolisi non solo potrebbe indurre il rilascio di interferenti all'interno del test ma potrebbe anche rendere più

difficoltosa la lettura e l'individuazione delle bande da parte dell'utente che lo sta utilizzando, dal momento che verrebbe introdotta una colorazione di background;

- **Tempo di comparsa delle bande:** verrà determinato il tempo di comparsa della banda di controllo e della banda test, parametri in grado di restituire informazioni sul corretto flusso della soluzione all'interno della striscia reattiva;
- **Dissociazione del marcato:** viene valutata visivamente la sovrapposizione del fronte del campione diluito e del marcato. Nel caso in cui tale sovrapposizione non sia presente, il campione diluito non è stato correttamente marcato e il test può risultare invalido o restituire un falso negativo;
- **Confronto finale:** i risultati di ciascuna configurazione saranno confrontati con gli stessi dati ricavati nel caso del test standard, in modo da identificare miglioramenti e peggioramenti rispetto alla condizione di partenza.

2.2.3 Preparazione strisce reattive

Per prima cosa, è necessario preparare le strisce reattive specifiche per i test relativi a PSA e IgE. Come già accennato in precedenza, la componente principale di tali strisce viene acquistata in laminati già assemblati (Figura 28), sui quali l'unico componente mancante è il *pad* assorbente. Quest'ultimo viene accoppiato con il resto dei materiali una volta che il laminato è stato opportunamente trattato e lavorato durante i processi di semina.



Figura 28: Immagine rappresentativa di un laminato assemblato con e senza *pad* assorbente per la raccolta del campione da analizzare. L'immagine riporta i laminati venduti dall'azienda *MDI -Membrane Technologies*.

Il trattamento preliminare del laminato prevede la semina di anticorpi in corrispondenza della membrana in nitrocellulosa per realizzare le due bande, accompagnata dalla deposizione di anticorpi primari marcati con oro colloidale in corrispondenza del *conjugate pad*. Per realizzare tale operazione viene utilizzato un macchinario *ad hoc* per questa tipologia di lavorazione e che viene chiamato *IsoFlow Flatbed Dispenser* (Imagene Technology) (Figura 29).



Figura 29: Dettaglio relativo alle tre pompe utilizzate dall'*IsoFlow Dispenser* per la semina delle strisce reattive.

Come è possibile notare dalla figura precedente, il macchinario è dotato di tre differenti pompe, ciascuna delle quali è a sua volta collegata ad una *vial* contenente la soluzione da depositare sulla membrana reattiva. La deposizione effettiva delle soluzioni di interesse avviene grazie alla presenza di due aghi e un ugello metallico, caratterizzati da cavità con diametro interno rispettivamente pari a 0.4mm e 0.8mm. In particolare, i primi due aghi vengono utilizzati per la deposizione degli anticorpi sulle due bande (Figura 30), mentre l'ugello viene utilizzato per dispensare la soluzione marcante sul *conjugate pad*.

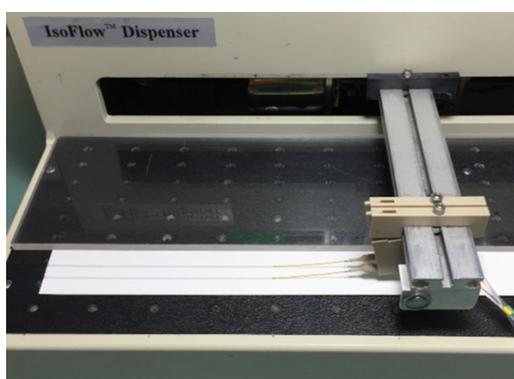


Figura 30: Immagine rappresentativa del funzionamento della *IsoFlow Dispenser*.

Per realizzare correttamente un laminato di questo tipo, occorre per prima cosa preparare le soluzioni contenenti gli anticorpi e l'oro colloidale. Le prime due soluzioni ad essere preparate sono quelle contenenti gli anticorpi da depositare sulla nitrocellulosa per la formazione della banda test e della banda di controllo. In entrambi i casi, la base della soluzione è una miscela preparata con acqua distillata e saccarosio all'1%. Tale zucchero, possedendo una struttura ramificata, ha una funzione di distanziatore fra gli anticorpi sospesi in modo tale che, una volta depositati sulla membrana reattive, risultino uniformemente distribuiti all'interno delle due bande. Considerando quelle che sono le concentrazioni degli anticorpi, per una questione di riservatezza aziendale, non saranno citate le loro concentrazioni all'interno della soluzione preparata. Considerando invece la sospensione di oro colloidale, essa viene realizzata a partire da sali d'oro che vengono successivamente trattati con sodio-citrato, ovvero una sostanza con effetto riducente il cui compito è quello di andare a frammentare i sali di partenza per poterli trasformare in nano-particelle. Una volta completata tale operazione, le nano-particelle vengono trattate attraverso un processo di coniugazione, ovvero una lavorazione all'interno della quale la loro superficie viene ricoperta solitamente con degli specifici anticorpi primari. In casi più rari, ovvero quando l'antigene di interesse è a sua volta un anticorpo, la superficie delle particelle può essere ricoperta da anticorpi secondari. Il risultato finale di questo processo può essere riassunto attraverso la seguente immagine (Figura 31):

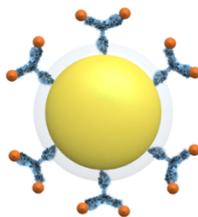


Figura 31: Rappresentazione di una nano-particella d'oro ricoperta di anticorpi.

Infine, le particelle d'oro sono completate attraverso un processo di saturazione, durante il quale la loro superficie non accoppiata con gli anticorpi viene ricoperta con BSA (albumina di siero bovino). Il ruolo di tale proteina è semplicemente quello di andare a ricoprire la superficie libera delle particelle in modo tale che gli antigeni d'interesse, o altre componenti presenti all'interno del campione analizzato, non possano andarsi ad insinuare nelle zone potenzialmente libere, ovvero non marcate con un anticorpo.

Dal momento che il riconoscimento dell'antigene avviene attraverso l'utilizzo di anticorpi primari specifici per ciascuno di essi, le soluzioni di oro colloidale e delle due bande presenteranno al loro interno immunoglobuline differenti. Nello specifico, gli anticorpi utilizzati sono i seguenti:

- **Goat anti-mouse IgG:** anticorpo secondario policlonale utilizzato per la realizzazione di entrambe le bande di controllo dal momento che la sua unica funzione è quella di immobilizzare sulla nitrocellulosa le particelle d'oro andando a legarsi con gli anticorpi primari coniugati ad esse;
- **Mouse anti-Human IgE:** anticorpo secondario policlonale che viene utilizzato sia come elemento per ricoprire le particelle d'oro della soluzione marcante, sia come anticorpo di riconoscimento nella soluzione della banda di controllo;
- **Mouse anti-Human PSA:** anticorpo primario monoclonale che viene utilizzato sia come elemento per ricoprire le particelle d'oro della soluzione marcante, sia come anticorpo di riconoscimento nella soluzione della banda di controllo;

Per concludere, una volta che le soluzioni appena descritte sono state completate, le *vial* che le contengono sono state accoppiate con l'*Isoflow Dispenser* in modo da poter seminare i laminati a disposizione. Per poterlo fare però è necessario impostare alcuni parametri fondamentali di tale macchinario, in modo tale che sulle membrane reattive vengano depositati i corretti volumi di anticorpi e marcato. Tali parametri sono riassunti nella tabella seguente (Tabella 4):

Parametri di semina delle membrane reattive				
Parametri	Velocità di semina [mm/s]	Densità test line [$\mu\text{l}/\text{mm}$]	Densità control line [$\mu\text{l}/\text{mm}$]	Densità marcato [$\mu\text{l}/\text{mm}$]
Test PSA	30	0,06	0,07	0,2
Test IgE	30	0,06	0,06	0,1

Tabella 4: Dato relativi ai parametri di semina utilizzati per la realizzazione delle strisce test.

Una volta portata a termine la semina, i laminati sono completati con l'aggiunta del pad assorbente, il quale deve essere posizionato manualmente facendo in modo che fra esso e il *conjugate pad* vengano garantiti 2 mm di sovrapposizione per ottenere una corretta continuità di flusso fra le due membrane. Infine, i laminati così ottenuti vengono lasciati in stufa ad una temperatura di 50 °C per circa due ore e dopodiché vengono fatti riposare in camera secca per circa 12 ore.

2.2.4 Preparazione soluzione diluente

Facendo sempre riferimento ai test per PSA ed IgE, devono essere preparate delle soluzioni diluenti che permettano di garantire il flusso del campione di sangue all'interno della striscia e l'aumento dell'affinità dell'antigene con gli anticorpi seminati. In questi due specifici casi, la soluzione diluente utilizzata risulta essere la stessa dal punto di vista della composizione. Sempre per una questione di riservatezza, verranno riportate le sostanze utilizzate a titolo informativo ma non verranno specificati quelli che sono i loro volumi e i loro rapporti percentuali. Nello specifico, la soluzione diluente contiene al suo interno:

- Tri-sodio-citrato;
- Glicina;
- Tween-20: Sodio Azide:

Oltre a questa soluzione, sono state preparate altre miscele diluenti ma che sono state utilizzate solamente per la caratterizzazione della bagnabilità del materiale sfruttato nella fase di prototipazione. Per questo motivo, il loro processo di preparazione e la loro composizione non vengono riportati, poiché considerate informazioni secondarie ai fini della trattazione.

2.2.5 Prelievo campioni di sangue

Nell fase di sperimentazione, i campioni di sangue da utilizzare sono stati ricavati da donatori interni all'azienda ma, per questioni di sicurezza, non coinvolti in operazioni legate a attività di laboratorio. I campioni raccolti appartengono a sangue capillare ricavato successivamente all'utilizzo di lancette pungi-dito e sono stati raccolti attraverso l'utilizzo di pipette di precisione con volume impostato. I campioni sono stati dopodiché raccolti in *vial* contenenti EDTA (Figura 32), un agente chelante che evita la coagulazione del sangue. Per questo motivo, tutte le prove effettuate non tengono conto delle possibili complicazioni legate alla coagulazione del sangue.



Figura 32: *Vial* contenente un campione di sangue trattato con EDTA.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Validazione materiale e processo di prototipazione

Come anticipato nel precedente capitolo, la prima tipologia di analisi svolta è stata una caratterizzazione della morfologia superficiale presente sui prototipi stampanti in 3D, in modo da determinare l'idoneità di tale processo di stampa per la sperimentazione di interesse. Le analisi sono state svolte sulla superficie del dispositivo rappresentato in figura (Figura 33).

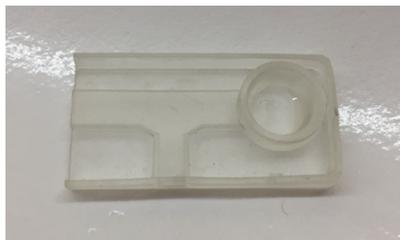


Figura 33: Vista del dispositivo su cui sono state effettuate le prove di rugosità per determinare l'idoneità del processo di prototipazione.

L'immagine precedente riporta il primo prototipo realizzato ed utilizzato per la sperimentazione. Esso presenta due canali perpendicolari in cui dovranno scorrere sangue e diluente ed un pozzetto in cui il diluente dovrà essere dispensato.

Nello specifico, i dati sono stati ricavati su una superficie campionaria di 1 mm^2 con un ingrandimento $20\times$ dello strumento di microscopia. La superficie campionaria valutata corrisponde alla faccia inferiore del canale principale presente all'interno del dispositivo, dal momento che essa è fondamentale al funzionamento del prototipo. Inoltre, essendo le superfici

interne quelle più difficili da stampare in 3D, l'area selezionata corrisponde al caso peggiore che può essere individuato in una configurazione di questo tipo.

Le immagini inizialmente ricavate presentavano un evidente gradiente di altezza ai due estremi dell'area campionaria, il che indica la non perfetta planarità della superficie stampata. Tale inclinazione è probabilmente dovuta alla modalità con cui il pezzo è stato stampato. Infatti, per limitare l'utilizzo dei supporti e soprattutto per evitare il loro inserimento all'interno dei canali, questo prototipo è stato inserito all'interno del piano di stampa con un'inclinazione di 80° (Figura 34), condizione che potrebbe aver indotto una non perfetta planarità di tale superficie.

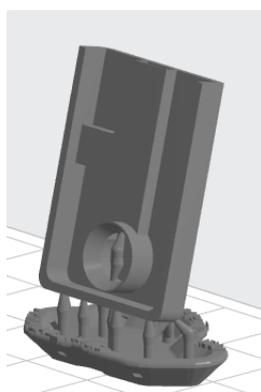


Figura 34: Immagine che rappresenta la disposizione del prototipo all'interno del piano di stampa.

Tuttavia, analizzando più nel dettaglio, è stato stimato un angolo di inclinazione di circa 5° , valore che è stato poi utilizzato per correggere l'orientamento dell'immagine. La rappresentazione finale della superficie è riportata qui di seguito (Figura 35).

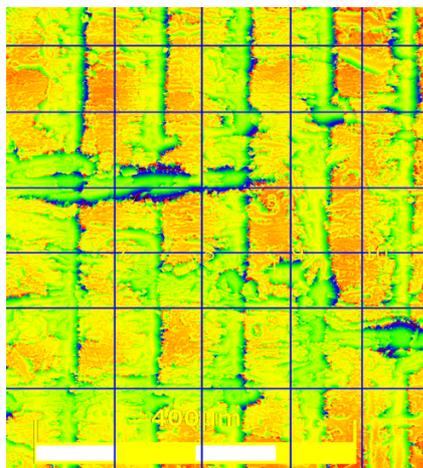


Figura 35: Immagine scattata attraverso un microscopio ottico e che mostra il forte orientamento della rugosità superficiale.

Considerando la figura precedente, è possibile notare come la superficie presenti una serie di picchi e avvallamenti che si ripetono periodicamente. Ciò è dovuto alla deposizione in serie dei piani di materiale l'uno sopra l'altro, ma che nei loro punti di contatto non risultano essere caratterizzati da una continuità spaziale ottimale. Sempre osservando l'immagine, è possibile notare come siano state posizionate tramite un opportuno software delle rette sulle quali sono stati calcolati i valori di rugosità di interesse. In particolare, sono state inserite 12 rette di cui 5 verticali e 5 orizzontali, in modo da limitare l'errore di stima dei parametri di interesse a causa dell'anisotropia della morfologia superficiale. La stessa tipologia di analisi è stata svolta anche su una cassetta in HDPE fornita dall'azienda in modo tale da avere, seppur su un materiale differente, dei valori di riferimento con cui andare a confrontare i dati ottenuti. I principali dati ricavati sono stati riportati nella tabella seguente (Tabella 5):

DATI DI RUGOSITÀ				
Tipologia di parametro	Stampaggio ad iniezione		Stampa 3D	
	Media [μm]	Dev. Std. [μm]	Media [μm]	Dev. Std. [μm]
R_A	0,97	0,097	6.12	1.82
R_Q	1,29	0,195	8.53	2.31
R_T	11,65	4,56	67.45	17.38

Tabella 5: Tabella contenente i principali dati di rugosità di interesse nell'analisi tra cui scostamento medio dalla superficie teorica (R_A), scostamento quadratico medio dalla superficie teorica (R_Q) e massima distanza picco-avvallamento (R_T).

Come prima cosa, è possibile notare come ovviamente il processo di stampa 3D restituisca dei valori di rugosità più elevati ed in particolare, il dato che risulta essere più impattante è sicuramente il valore medio assunto da R_T . Per questo motivo, tale parametro sarà indagato in questa fase successiva della sperimentazione, in modo tale da determinare se esso sia in grado di apportare delle sostanziali modifiche alla bagnabilità della superficie considerata. Per prima cosa, si è cercato di ricostruire la morfologia superficiale del prototipo stampato in 3D in funzione dei dati di rugosità ottenuti e del passo di stampa che è stato utilizzato nella prototipazione. La superficie dell'oggetto può dunque essere rappresentata schematicamente come mostrato nella seguente immagine (Figura 36):

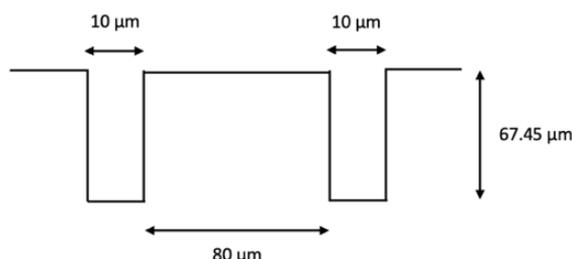


Figura 36: Rappresentazione schematica della morfologia superficiale sulla base dei dati di rugosità ottenuti al microscopio ottico.

Per comprendere se una morfologia superficiale di questo tipo possa indurre delle modifiche di bagnabilità sull'oggetto, si è deciso di analizzare la letteratura per individuare come le micro-geometrie possono influenzare il moto di un fluido. L'articolo di maggiore interesse trovato (Seemann, et al., 2005) individua una formula analitica che, basandosi sul rapporto fra altezza e larghezza degli avvallamenti presenti su una superficie, è in grado di stabilire un valore di angolo di contatto limite che la goccia che bagna la superficie può raggiungere. Se infatti questo angolo di contatto viene superato, la morfologia assunta dalla superficie è tale da rendersi idrofobica, andando dunque a compromettere l'interazione fra materiale e fluido. L'equazione precedentemente citata è la seguente (Equazione 6):

$$\theta_{lim} = \arccos \left(\frac{1}{1+2X} \right)$$

Equazione 6: Formula che permette di calcolare l'angolo limite di bagnabilità della superficie che la goccia di fluido può raggiungere.

Considerando l'equazione precedente, il valore indicato con X corrisponde al rapporto fra la larghezza e la profondità degli avvallamenti presenti sulla superficie. Utilizzando i dati ottenuti dall'analisi di microscopia, l'angolo limite in questo specifico caso è 86.6°, valore di cui si dovrà tenere conto successivamente, ovvero una volta valutati i valori di angolo di contatto assunti dai liquidi considerati nell'analisi. Per prima cosa, sono stati considerati nell'analisi gli angoli di contatto assunti dal sangue e dal diluente (indicato generalmente con il nome di tris-glicina), dal momento che queste due sostanze sono le principali interessate nella sperimentazione. Dopodiché, sono stati valutati anche gli angoli di contatto assunti da una soluzione fisiologica e dal buffer fosfato (PBS). Qui di seguito sono riportati i valori medi e le deviazioni standard ricavati dall'analisi (Tabella 6).

ANALISI ANGOLO DI CONTATTO				
Soluzione	Sangue	PBS	Fisiologica	Tris-glicina
Media [°]	55.93	47.8	60.2	54.6
Dev. Std. [°]	5.17	7.1	9.1	6.7

Tabella 6: Tabella riassuntiva delle prove di angolo di contatto, contenente le soluzioni testate e i dati relativi a media e deviazione standard.

I dati precedenti mostrano come in generale la superficie risulti essere caratterizzata da una buona idrofilicità nei confronti dei fluidi sperimentati. Inoltre, ricordando il valore di angolo limite individuato in precedenza, è chiaro come tutte le sostanze analizzate abbiano un angolo di contatto ben lontano da tale valore. In particolare, ci si è poi concentrati sul valore di angolo di contatto medio assunto dal sangue. Tale valore è di fondamentale importanza dal momento che esso deve essere utilizzato come elemento di progettazione per la valvola capillare ad un livello. Inoltre, questo dato è stato considerato in ottica futura, ovvero lo si è confrontato con l'angolo di contatto assunto dal sangue con altri materiali tipicamente utilizzati in questo ambito applicativo. Nello specifico, è stato possibile notare come questo angolo di contatto sia molto simile a quelli assunti dal sangue con il polietilene, il policarbonato e il PMMA (Torrise & Scolaro, 2017).

3.2 Prove di tenuta della valvola ad un livello

Per prima cosa, è stata data la precedenza alla valvola capillare ad un livello, dal momento che una configurazione contenente questo tipo di valvola è più semplice da realizzare e produrre nel momento in cui venisse dimostrato il suo corretto funzionamento. Il primo prototipo realizzato è quello mostrato nella Figura 33 e che per comodità è stato riportato nuovamente qui di seguito. Per quanto riguarda le dimensioni, esse sono state selezionate attraverso l'utilizzo del modello analitico di Lucas-Washburn, con cui è stato ricavato il grafico mostrato qui di seguito (Grafico 3):

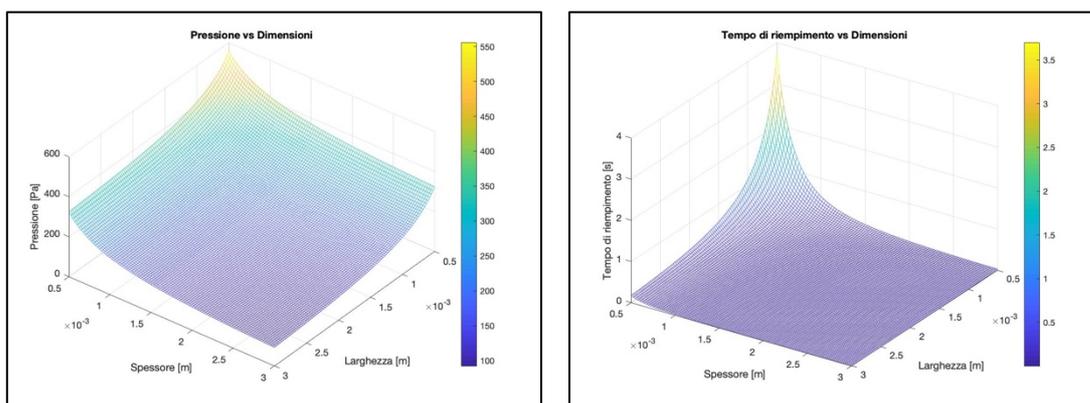


Grafico 3: Esempio di grafici ottenibili attraverso la risoluzione dell'equazione di Lucas-Washburn. In particolare, è possibile ricavare il tempo di riempimento del canale di raccolta del sangue in funzione delle dimensioni caratteristiche del canale rettangolare.

Il grafico precedente è stato ricavato inserendo, nel codice implementato in ambiente *Matlab*, il valore di angolo di contatto del sangue determinato nelle prime fasi di sperimentazione. Osservando i dati, è possibile notare come i tempi di riempimento siano in generale molto bassi indipendentemente dalle dimensioni della sezione considerati. Tuttavia, si è deciso di utilizzare un canale rettangolare con dimensioni pari a 1mm per lo spessore e 3.5mm per la larghezza. Tale scelta è stata fatta tenendo anche conto del valore di pressione capillare che un canale di questo tipo può generare, in modo da garantire un corretto ed efficiente prelievo di sangue. Per prelevare esattamente 30 μL di sangue, la lunghezza del canale deve essere dunque impostata ad un valore di 7.5mm. Alla fine di tale canale, è stata inserita una valvola capillare ottenuta imponendo un cambio di sezione con un angolo di 55° , valore che è stato selezionato in funzione dei dati ottenuti dall'analisi di angolo di contatto, tenendo conto dell'Equazione 2 e introducendo un fattore di sicurezza. Per simulare nella maniera migliore possibile la deposizione di sangue da parte di un generico utente e per verificare in maniera più controllata la tenuta della valvola capillare, si è deciso di andare a dispensare 10 μL di sangue ad ogni passaggio. L'operazione appena descritta è stata svolta su 5 campioni differenti. I risultati ottenuti con questa configurazione possono essere riassunti attraverso la seguente immagine (Figura 38) e sono validi per tutti i campioni sperimentati in questa fase:

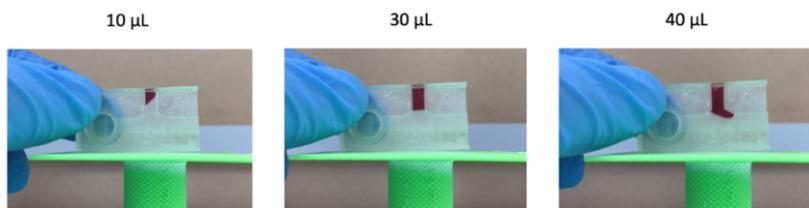


Figura 37: Sequenza rappresentante il comportamento della valvola capillare nella fase di riempimento.

Come è possibile osservare dalla sequenza precedente, la valvola capillare sperimentata non è caratterizzata da un corretto funzionamento. Infatti, l'aggiunta di una quantità ulteriore di sangue, che raggiunge dunque un volume totale pari a 40 μL , non viene bloccata in corrispondenza del cambio di sezione. La spiegazione a questo funzionamento anomalo può essere spiegata analizzando più nel dettaglio la letteratura scientifica disponibile. Infatti, facendo particolare riferimento al lavoro svolto da Melin et al. (J, et al., 2004), è possibile osservare come una valvola capillare ad un livello può essere realizzata efficacemente solamente nel caso in cui il canale in cui far scorrere il fluido di interesse sia caratterizzato da un *aspect ratio* fra spessore e larghezza pari ad almeno 12.5 (Figura 39), mentre nella configurazione precedente tale valore risulta essere molto più basso e pari a circa 0,3.

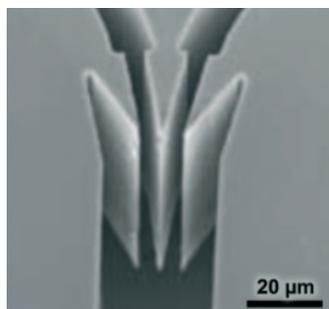


Figura 38: Immagine di microscopia relativa ad una valvola capillare ad un livello. Come è possibile notare, l'aumento di sezione garantisce il blocco di un fluido solamente nel caso di un canale dotato di uno spessore molto più elevato rispetto alla larghezza.

Queste ultime considerazioni non solo permettono di comprendere l'inefficacia della valvola nel trattenere il sangue, ma portano anche ad un cambio relativo alla progettazione del dispositivo. Infatti, per poter rispettare allo stesso tempo il vincolo relativo *all'aspect ratio* e il vincolo legato al contenimento di costi e dimensioni, sarebbe necessario realizzare un canale dotato di una larghezza molto ridotta. Ottenere questo risultato sia nella fase di prototipazione che nella fase di produzione per stampaggio ad iniezione risulterebbe molto complesso e non facilmente realizzabile, dunque nelle prossime fasi della sperimentazione si cercherà di

determinare i parametri ottimali che garantiscano un corretto funzionamento di una valvola capillare a due livelli.

3.3 Prove di tenuta valvole a due livelli

Considerando ora la progettazione di una valvola capillare a due livelli, sono stati utilizzati dei prototipi la cui struttura generale può essere riassunta con la seguente figura (Figura 40). Essi presentano una geometria semplice ma che permette di andare a considerare tutti i parametri di interesse descritti nel precedente capitolo.

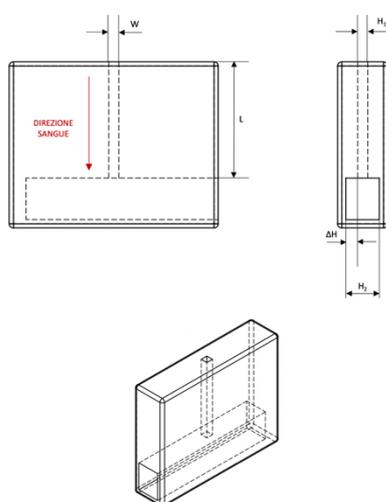


Figura 39: Schema dei dispositivi utilizzati per la sperimentazione dei parametri che influenzano il funzionamento della valvola capillare a due livelli.

Come è possibile notare, i dispositivi sono caratterizzati da due canali perpendicolari fra loro, di cui il più piccolo realizzato per accumulare il volume di sangue desiderato, mentre il secondo viene utilizzato per garantire principalmente il cambio di spessore a cavallo della valvola capillare. Dal punto di vista delle dimensioni, lo spessore del canale capillare per la raccolta di sangue è stato mantenuto costante e pari ad 1mm all'interno di tutti i prototipi sperimentati. Inoltre, come mostrato nel capitolo precedente, l'angolo che permette di garantire la massima caduta di pressione e garantire al meglio il funzionamento della valvola risulta essere pari a 90° . Per evitare di prendere in considerazioni troppi parametri che potessero appesantire la sperimentazione e per porsi anche in una condizione di sicurezza, si è deciso di mantenere tale angolo all'interno di tutte le configurazioni analizzate. In questa fase di sperimentazione, i canali a monte della valvola capillare sono stati riempiti dall'alto. Questa scelta è stata fatta sia per la semplicità con cui tali canali possono essere riempiti, sia per tenere conto del contributo

della condizione peggiore, e dunque del volume di sangue utilizzato, nell'efficacia della tenuta della valvola capillare. Infine, sono stati ricavati dei grafici relativi alla percentuale di successo associata ad ogni configurazione, ricordando che una valvola capillare è stata considerata funzionante solamente nel momento in cui essa sia stata in grado di mantenere bloccato il sangue per almeno 1 minuto. Tali grafici sono riportati qui di seguito (Grafico 4):

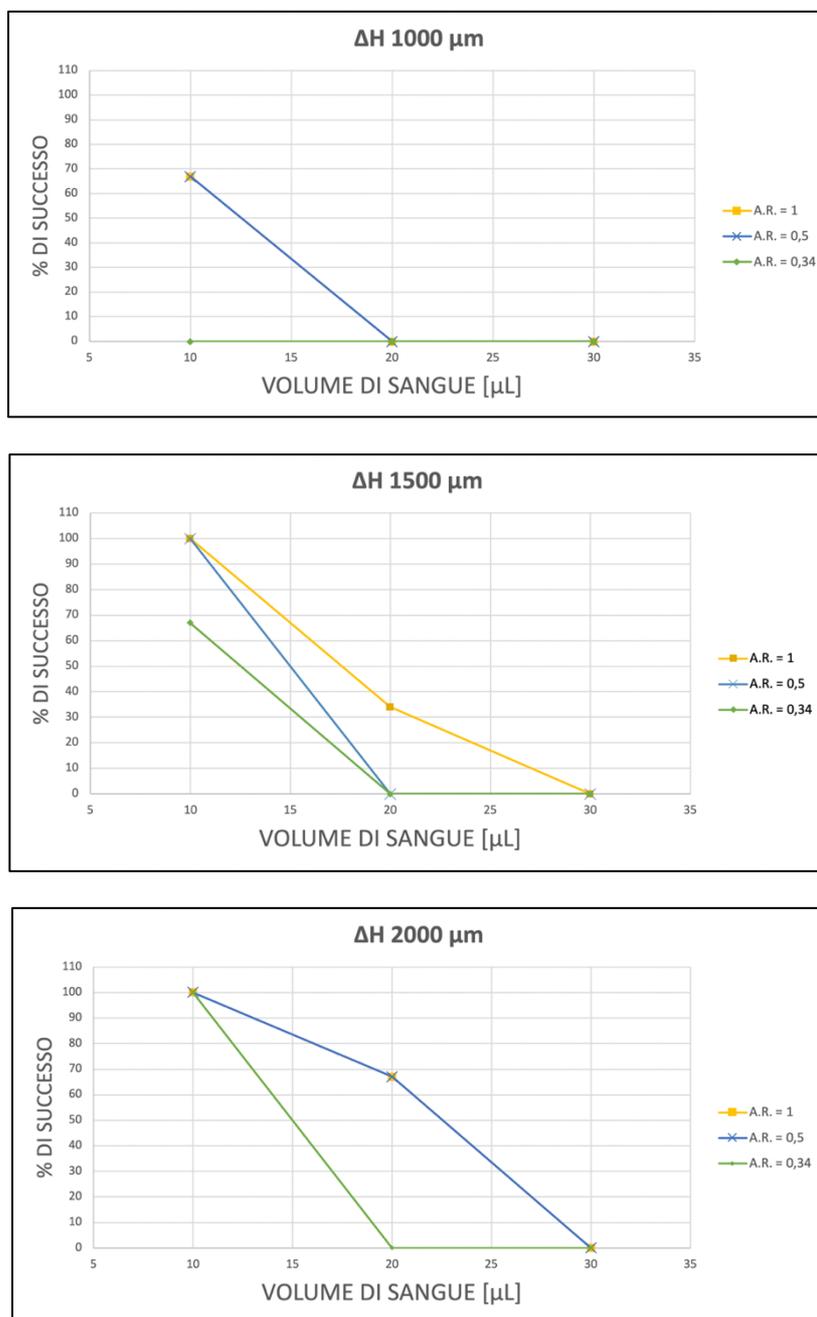


Grafico 4: Grafici che mostrano l'andamento delle curve di successo in funzione dei parametri considerati nella fase di progettazione. In particolare, sono riportate le curve di successo nei tre principali casi di ΔH, ovvero A) 1000 μm B) 1500 μm c) 2000 μm.

Per prima cosa, è opportuno sottolineare come non siano stati riportati i dati ottenuti nel caso di configurazioni contenenti un ΔH pari a $500 \mu\text{m}$, dal momento che in nessuno di questi casi è stato bloccato il sangue in corrispondenza della valvola capillare. Questo risultato si è verificato indipendentemente dal volume e dall'*aspect ratio* considerato (Figura 41). Fatta questa considerazione, osservando i dati precedenti è evidente come tutti e tre i parametri analizzati per la progettazione di una valvola capillare a due livelli abbiano un impatto sul funzionamento di tale componente, seppur con qualche differenza in termini di importanza.

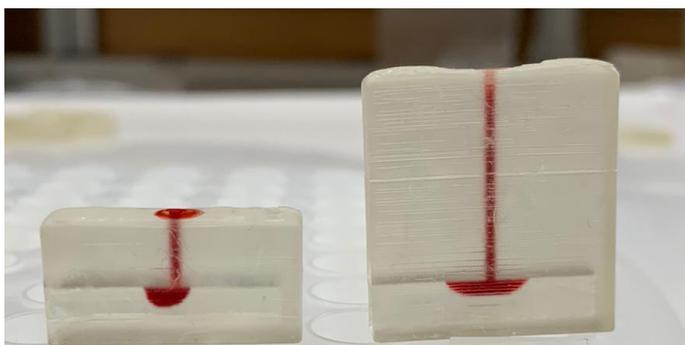


Figura 40: Immagini che testimoniano l'inefficienza della valvola capillare a due livelli nel caso di un ΔH pari a $500 \mu\text{m}$.

Il primo aspetto che può essere evidenziato fra un grafico e l'altro è sicuramente il fatto che, all'aumentare del valore di ΔH , l'efficacia globale della valvola capillare aumenta. Questo risultato è ragionevole poiché, considerando ad esempio la legge di Bernoulli, è noto come la caduta di pressione fra due condotti comunicanti sia proporzionale alla differenza di sezione resistente che li caratterizza. Successivamente, osservando un grafico per volta, è possibile notare come anche all'aumentare dell'*aspect ratio* l'efficacia di tenuta della valvola aumenti. Tale dato è concorde con la letteratura a disposizione, dal momento che nel caso di valori pari a 1, ovvero nel caso di canali con sezione quadrata, viene minimizzata la superficie occupata da un generico fluido in corrispondenza della valvola capillare. Questa condizione permette di minimizzare la caduta di pressione necessaria a bloccare il sangue in tale punto, anche se è comunque interessante osservare come le curve di successo con *aspect ratio* pari a 1 e 0.5 siano caratterizzate, a parità dei restanti parametri, da andamenti molto simili.

Infine, l'ultimo aspetto che occorre considerare in questa fase sperimentale è l'andamento delle curve di successo in funzione del volume di sangue prelevato. Il risultato più evidente a disposizione è sicuramente il fatto che in nessuna delle configurazioni trattate è stato bloccato un volume di sangue pari a $30 \mu\text{L}$ (Figura 42).

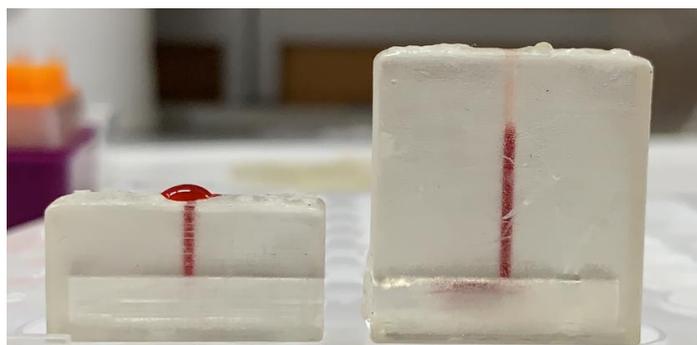


Figura 41: Immagini relative all'effetto del volume del campione sulla tenuta della valvola capillare a due livelli. In questo caso, sono rappresentate de valvola contenenti rispettivamente 10 μL e 30 μL .

Questo risultato è di grande importanza in questa specifica trattazione, dal momento che la maggior parte dei test sviluppati dall'azienda si basa sull'utilizzo di 30 μL come volume di campione da analizzare. Per questo motivo, è stato indagato ulteriormente questo aspetto, ovvero si è cercato di andare a far variare ulteriori parametri di progetto per capire se ci fosse la possibilità di ottenere una configurazione in grado di bloccare 30 μL di sangue. Nello specifico, sono state sperimentate delle configurazioni in cui è stato mantenuto costante il volume di sangue, ma anche l'*aspect ratio*, il cui valore è stato mantenuto pari a 1. Questa scelta deriva dai risultati ottenuti nella sperimentazione precedente, nella quale è stato possibile notare come tale parametro risulti essere il più efficace in termini di funzionalità del componente. Dunque, l'unico parametro che è stato fatto variare in questa fase di sperimentazione è il valore di ΔH . In particolare, sono state realizzate tre configurazioni all'interno delle quali sono stati sperimentati valori di ΔH pari a 2500 μm , 3000 μm e 3500 μm . Tuttavia, in nessuno dei casi appena elencati il volume di sangue desiderato è stato bloccato con successo dalla valvola capillare. Basandoci sui dati a disposizione, è possibile comunque ipotizzare che, esattamente come nel caso degli altri due volumi sperimentati, dopo un certo valore di ΔH sia possibile ottenere un dispositivo funzionante. Tuttavia, sarebbe necessaria una configurazione con un cambio di sezione ingente e che renderebbe difficilmente gestibile la valvola capillare rispetto alla configurazione del test già in uso. Per questi motivi, è stato deciso di abbandonare la ricerca di una configurazione che permetta di bloccare 30 μL di sangue all'interno di un unico canale. Questa scelta progettuale ha un ulteriore effetto sulla realizzazione del dispositivo, ovvero quella di rendere necessario l'abbandono di un meccanismo di controllo di volume di diluente come quello mostrato all'interno del brevetto US6261519B1. In questo caso infatti, dovrebbe essere bloccato un volume di sangue e diluente che complessivamente dovrebbe essere pari ad almeno 90 μL e, come è appena stato mostrato, l'ottenimento di una condizione di questo tipo risulterebbe complessa da individuare a livello sperimentale. Tuttavia, considerando i dati a disposizione, è possibile notare come siano state

individuate delle configurazioni che, seppur caratterizzate da un volume di sangue pari a 10 μL e 20 μL , sono comunque in grado di bloccare efficacemente il sangue. Dunque, sarebbe possibile bloccare un volume di sangue pari a 30 μL , a patto di suddividerlo in canali diversi ed ognuno dei quali contenente un volume di sangue controllabile in maniera efficiente. In particolare, i dati mostrano come un volume pari a 10 μL possa essere fermato dalla valvola in maniera relativamente semplice. Infatti, già con un ΔH pari a 1000 μm , questo volume viene bloccato con relativa efficienza e all'aumentare di tale parametro sono stati ottenuti dei risultati che mostrano un'efficienza del 100% in termini di funzionamento. Dei risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso di un volume pari a 20 μL , ma con un'efficienza inferiore. Per questo motivo, da questo momento in avanti verranno analizzate delle configurazioni che presentano al loro interno dei canali in grado di suddividere il volume di sangue richiesto dal test in differenti canali, ognuno dei quali conterrà al massimo un volume di sangue pari a 10 μL . Come è stato anticipato nella parte introduttiva di questo lavoro, l'idea principale è quella di riuscire ad inserire un meccanismo di controllo di volume di sangue all'interno della configurazione già esistente, in modo tale da ridurre il numero di componenti presenti all'interno del kit e in modo tale da poter utilizzare un metodo alternativo e più efficiente rispetto alla micro-pipetta capillare. Per queste ragioni, verranno prese in considerazione due principali configurazioni da questo momento in avanti: la prima verrà identificata con il nome di tappo capillare, mentre la seconda verrà identificata con il nome di chip capillare (Figura 43).

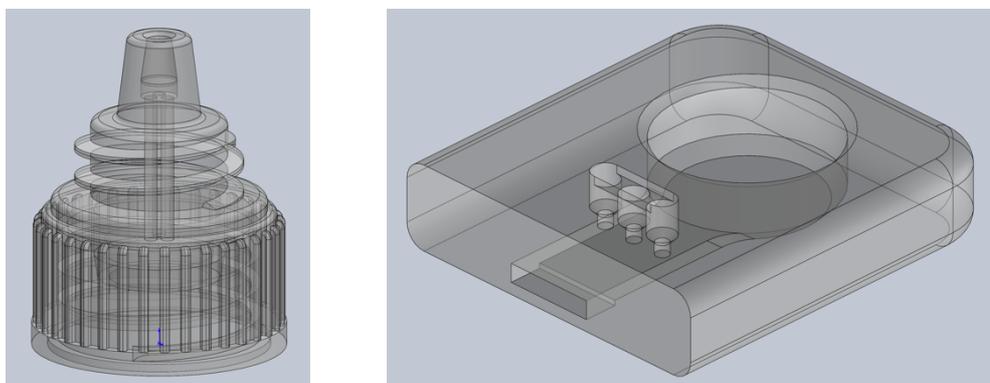


Figura 42: Immagini relative al tappo capillare e al chip capillare, dalle quali è possibile notare la presenza di più canali per riuscire ad accumulare e bloccare un volume di sangue pari a 30 μL .

Le due immagini appena riportate mostrano i disegni CAD delle due principali configurazioni analizzate, le quali sono state opportunamente progettate sulla base dei risultati ottenuti fino a questo punto. Nello specifico, è possibile notare come in entrambi i casi siano presenti tre canali capillari per la raccolta del sangue, caratteristica concorde con la possibilità di andare a bloccare efficacemente un volume di sangue pari al massimo a 10 μL . Un'altra caratteristica comune ai due dispositivi è sicuramente il fatto che ognuno di essi è caratterizzato da un ingresso comune per i tre canali di raccolta del sangue, scelta che si è resa necessaria per evitare un incremento di operazioni che l'utente del test dovrebbe svolgere. In caso contrario infatti, l'utente dovrebbe riempire tre canali indipendenti fra loro, il che porterebbe ad un aumento di complessità del test e del numero di operazioni da svolgere. Infine, l'ultima caratteristica comune è la presenza di canali con sezione circolare e non rettangolare come visto fino a questo punto. Questa scelta progettuale è dovuta a diverse considerazioni. Per prima cosa, la presenza di una sezione circolare ricade nella specifica di progetto individuata durante la costruzione delle curve di successo, secondo cui il canale di raccolta per il sangue debba essere necessariamente caratterizzato da un *aspect ratio* pari a 1. Un canale con sezione circolare potrebbe essere approssimato infatti ad un canale con sezione quadrata, dal momento che la dimensione relativa allo spessore e alla larghezza risulterebbero essere uguali fra loro. Inoltre, a parità di dimensione caratteristica, un canale con sezione circolare sarebbe dotato di un'area inferiore rispetto ad un canale con sezione quadrata, andando dunque a minimizzare ulteriormente la caduta di pressione necessaria a cavallo della valvola per garantire il corretto blocco del volume di sangue desiderato.

Una seconda considerazione che ha portato alla scelta di una geometria cilindrica è il fatto che in questo modo non sarebbero presenti degli spigoli vivi all'interno del canale, punti in cui vi è la possibilità di un ristagno ed accumulo di sangue. In questo caso dunque, una certa frazione di sangue, che potrebbe essere comunque trascurabile, resterebbe bloccata all'interno del canale senza la possibilità di essere rilasciata efficacemente sulla striscia reattiva. Infine, la scelta di un canale circolare porta alla creazione di pressioni capillari maggiori rispetto ad una sezione quadrata e, nonostante un aumento della lunghezza del canale dovuta ad una sezione resistente minore, è possibile comunque ottenere dei tempi di riempimento compatibili fra una tipologia di sezione e l'altra. Le considerazioni appena fatte possono essere osservate con riferimento ai seguenti grafici ottenuti attraverso i codici *Matlab* descritti in precedenza e riportati all'interno dell'appendice di questo elaborato (Grafico 5).

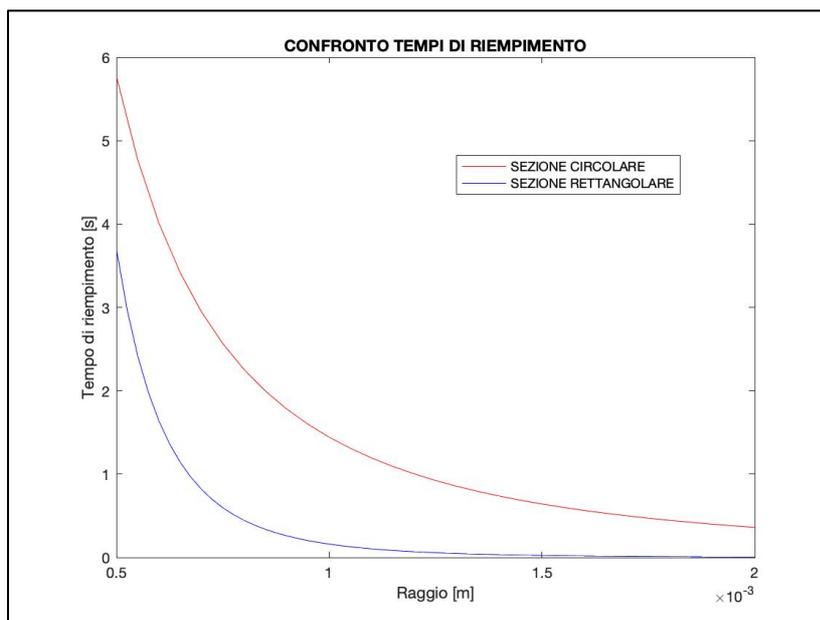


Grafico 5: Confronto dei tempi di riempimento fra canali con sezione circolare e sezione rettangolare.

Infine, la progettazione delle valvole capillari è stata completata tenendo conto anche di ulteriore dato. In particolare, facendo riferimento alla letteratura individuata, è utile sottolineare come le valvole capillari siano dotate di un più efficace funzionamento nel momento in cui la dimensione caratteristica del canale risulti essere inferiori ad 1mm. Dunque, in ciascuna configurazione si è deciso di utilizzare canali circolari con raggio pari a 0.5mm, in modo da rispettare la specifica di progetto appena citata e al tempo stesso non avvicinarsi troppo ai limiti di risoluzione del processo di stampa 3D.

3.4 Sperimentazione tappo capillare

La prima tipologia di configurazione effettivamente sperimentata in questa fase è stata il tappo capillare. In questo caso è stata operata una scelta fortemente conservativa, ovvero è stato mantenuto il design originale del tappo attualmente utilizzato nel kit venduto dall'azienda e all'interno di esso è stato inserito il meccanismo di controllo di volume descritto nel paragrafo precedente. Questa scelta non solo permette di minimizzare i cambiamenti sul kit già esistente, ma è efficace anche dal punto di vista progettuale, dal momento che il diametro interno del tappo risulta essere pari a 8mm che, se confrontato con il diametro di 1mm dei canali di raccolta di sangue, garantisce un ΔH pari a 3500 μm , valore che rispetta le specifiche di

progetto precedentemente descritte. L'efficacia di tale scelta è testimoniata dalle seguenti immagini, le quali mostrano come il volume di sangue in eccesso venga mantenuto all'esterno del tappo sia nel caso in cui esso sia stato montato sul flacone, sia nel caso in cui sia stato riempito come componente preso singolarmente (Figura 44).



Figura 43: Immagini che mostrano la capacità del tappo capillare di mantenere all'esterno della configurazione il volume di sangue in eccesso depositato all'imboccatura del componente.

Per quanto riguarda il meccanismo di collegamento fra il tappo e il flacone, ovviamente è stato mantenuto l'accoppiamento filettato fra i due componenti, i quali presentano rispettivamente sulla superficie interna e esterna una filettatura M11. Allo stesso modo, è stato mantenuto il collegamento filettato fra tappo e copri-tappo, sui quali è presente una filettatura M5.

In questo caso, il principio di funzionamento del test si basa sulla ricezione da parte dell'utente di un flacone termosaldato e contenente il volume di diluente richiesto dal test. Dopodiché, una volta rimossa la termosaldatura, il tappo capillare verrebbe montato su di esso e solamente a seguito di questa operazione verrebbe raccolto il volume di sangue necessario al funzionamento del test. Se infatti questa operazione venisse completata prima che il tappo venga montato sul flacone, durante la fase di avvitamento si potrebbe verificare la fuoriuscita di sangue dal tappo dovuta alla pressione che si genera durante accoppiamento o a causa della pressione generata dalle dita dell'utente sul flacone mentre avviene il collegamento fra i due componenti. Infine, il test verrebbe completato attraverso il posizionamento del copri-tappo, seguito da un'azione di agitazione manuale da parte dell'utente. Questo ultimo passaggio permetterebbe la rottura della valvola capillare e la successiva diluizione del campione di sangue all'interno della soluzione diluente.

3.4.1 Test PSA

Il primo test sperimentato con questa configurazione è stato quello relativo al PSA. Innanzitutto, è stata validata la funzionalità delle strisce reattive prodotte dal punto di vista dell'efficacia della semina. Per fare ciò, è stato seguito il protocollo normalmente utilizzato nelle fasi di controllo qualità del prodotto. In particolare, viene valutata la corsa dell'oro colloidale sulla singola striscia e l'efficienza con cui le membrane prodotte sono in grado di discriminare un campione positivo da quello negativo. Nello specifico, il campione negativo viene simulato dispensando 90 μL di solo diluente sulla membrana, mentre il campione positivo è simulato con 60 μL di solo diluente e 30 μL di diluente all'interno del quale viene sospesa, con un rapporto di diluizione 1:10, una soluzione contenente PSA ad alta concentrazione (500 ng/mL). Il risultato è riportato qui di seguito (Figura 45).



Figura 44: Immagini relative al controllo qualità delle membrane reattive.

La precedente immagine mostra come sia i campioni positivi che i campioni negativi vengano correttamente individuati dalle strisce realizzate. Inoltre, i campioni positivi risultano essere in questo caso ben visibili ad occhio nudo. Successivamente, si è resa necessaria la sperimentazione su sangue trattato con EDTA per verificare la corretta funzionalità della configurazione sviluppata. Questo test è stato progettato precedentemente a questo progetto ed è stato impostato un cut-off pari a 4 ng/mL di sangue. In corrispondenza di tale valore, la banda test è caratterizzata da una colorazione tenue, motivo per cui i campioni positivi sono stati simulati riproducendo un sangue contenente una concentrazione di PSA pari 7 ng/mL per poter avere dei campioni dotati di una banda ben visibile. Non avendo la possibilità di quantificare il valore basale di PSA all'interno dei campioni raccolti, è stato utilizzato un sangue femminile caratterizzato da una concentrazione di PSA talmente bassa da poter essere considerata nulla. La prima operazione effettuata è stata la raccolta dati relativa ai valori di assorbanza, misurati allo spettrometro, delle membrane reattive trattate con configurazione attualmente in uso dall'azienda. La configurazione standard del test prevede l'utilizzo di 30 μL di sangue accompagnati da 60 μL di soluzione diluente. I dati raccolti su campioni positivi e negativi sono riassunti nelle tabelle seguenti (Tabella 7):

CAMPIONI NEGATIVI CONFIGURAZIONE STANDARD				
VOLUME [μ L]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	366,50	28,69	2,07	1,96
90	332,67	62,30	3,08	1,93
120	309,47	64,11	3,24	1,99

CAMPIONI POSITIVI CONFIGURAZIONE STANDARD				
VOLUME [μ L]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	382,8	39,7	84,6	9,7
90	386,2	36,2	81,7	6,9
120	363,5	47,1	82,7	5,4

Tabella 7: Raccolta dei dati ottenuti in termini di milli-assorbanza sui test effettuati sulla nuova configurazione, rispettivamente sui campioni negativi e positivi.

I dati raccolti verranno utilizzati in seguito come parametro di controllo per verificare l'attendibilità delle nuove configurazioni sperimentate. Inoltre, è opportuno sottolineare attraverso la figura seguente come i campioni positivi simulati siano ben visibili anche nel caso di prove effettuate su sangue (Figura 46).



Figura 45: Immagine che mostra il risultato visivo di un test per PSA valutato su un campione di sangue con concentrazione di 7 ng/mL e che risulta essere chiaramente visibile ad occhio nudo.

Per quanto riguarda la sperimentazione del tappo capillare, è importante sottolineare il fatto che tale configurazione, come descritto in precedenza, richiede necessariamente la presenza di una diluizione del campione prima che esso venga depositato sulla membrana reattiva. I test basati su pre-diluizione prevedono l'utilizzo di una quantità di soluzione diluente molto maggiore rispetto ai test più comuni. Sono infatti previsti in questo caso rapporti di diluizione pari a 1:20 e tale approccio viene solitamente utilizzato nel caso di antigeni con concentrazioni basse, in modo tale che possano essere più efficacemente isolati prima del loro rilascio sulla membrana reattiva. Inoltre, questi test sono accompagnati da concentrazioni di oro colloidale e anticorpi depositati sulla membrana molto più alte rispetto ai test non in pre-diluizione. Il test per PSA, così come quello per le IgE totali, non è stato progettato ipotizzando la presenza di una pre-diluizione, dunque un sangue positivo a 7 ng/mL verrebbe eccessivamente diluito

e l'antigene non verrebbe correttamente individuato dagli anticorpi seminati. Per questo motivo, sono stati simulati dei campioni positivi con concentrazioni più elevate rispetto a quelli prodotti per simulare i campioni di controllo. Tuttavia, per uniformare la raccolta dei dati sperimentali, i campioni positivi per la pre-diluizione sono stati prodotti in modo tale da riprodurre la concentrazione di PSA finale all'interno della soluzione globalmente rilasciata sulla membrana reattiva, ovvero quella composta da sangue e diluente. I calcoli che hanno portato alla produzione dei campioni di sangue positivo sono stati inseriti nell'apposita sezione dell'appendice riportata alla fine dell'elaborato, mentre per quanto riguarda i dati raccolti attraverso lo spettrometro, essi sono stati riportati nelle seguenti tabelle (Tabella 8).

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	345,5	62,2	20,3	21,6
90	338,6	35,5	17,8	7,8
120	213,8	97,0	33,1	28,9

CAMPIONI POSITIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	394,7	32,4	74,4	14,3
90	338,0	57,4	121,3	5,7
120	276,2	37,2	124,8	9,4

Tabella 8: Dati relativi all'assorbanza valutata sui test standard.

Tali dati possono essere complessivamente riassunti attraverso i seguenti grafici, i quali permettono di apprezzare in maniera più evidente le differenze in termini di assorbanza fra le quattro tipologie di test in relazione del volume di soluzione depositata sulla membrana reattiva (Grafico 6).

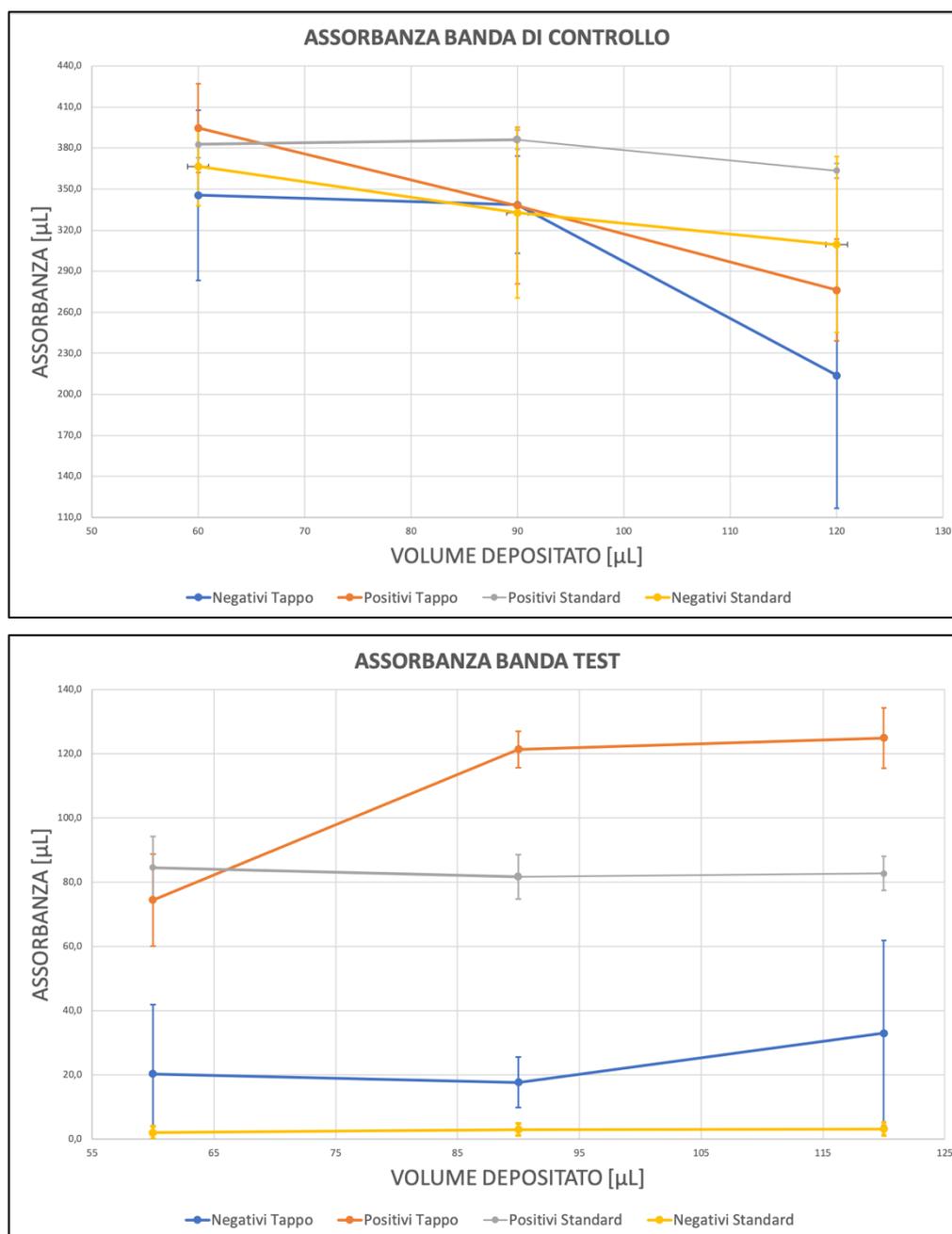


Grafico 6: Grafici che mostrano l'andamento rispettivamente delle assorbanze della banda di controllo e della banda test.

Facendo riferimento ai valori di assorbanza ottenuti per la banda di controllo, dal momento che tale elemento è inserito sul test come feedback visivo per l'utente, i dati raccolti in merito sono stati considerati come parametro in grado di dare informazioni sulla nitidezza del segnale ottenuto alla fine del test e sull'uniformità della corsa dell'oro colloidale nelle diverse condizioni. Osservando il primo grafico, indipendentemente dalla configurazione utilizzata e

dallo stato del campione, la distribuzione delle assorbanze delle bande di controllo può essere definita uniforme fra una condizione e l'altra. Tutte le curve presentano infatti un andamento decrescente e ciò può essere dovuto al fatto che, aumentando il volume di soluzione depositata sulla membrana, parte degli anticorpi marcati già presenti sulla banda di controllo vengano staccati da questa porzione della striscia e vengano trasportati verso il *wicking pad*. Questa condizione sembra esasperata nel caso dei campioni trattati con il tappo capillare, in particolare per un volume pari a 120 μL . Tale comportamento può essere spiegato dal fatto che, rispetto al test standard, la frazione di diluente in questo caso è molto più elevata e ciò potrebbe aver indotto una maggiore diluizione anche dell'oro colloidale depositato sul conjugate pad, riducendo la capacità di legame con gli anticorpi presenti sulla banda di controllo. Inoltre, nel caso di un volume di soluzione pre-diluente pari a 120 μL , è stato possibile notare il seguente comportamento su alcune membrane reattive (Figura 46):

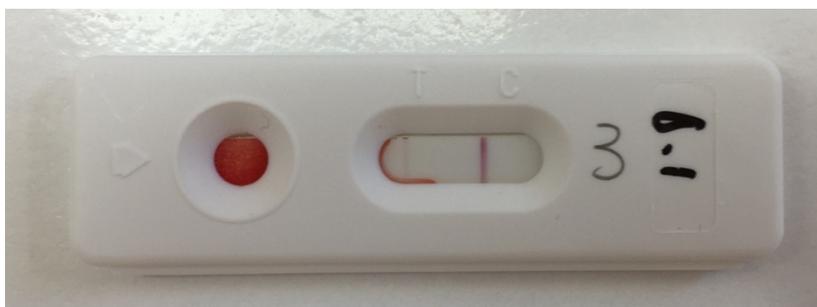


Figura 46: Immagine che rappresenta il leakage di sangue diluito nel caso in cui venga depositato un volume eccessivo di soluzione sulla membrana, che risulterebbe dunque saturata.

La foto mostra che, nel momento in cui sulla membrana venga depositata una quantità eccessiva di soluzione pre-diluente, il volume in eccesso venga direttamente accumulato sulla porzione di nitrocellulosa, introducendo una colorazione di background che può andare a ridurre il valore di assorbanza leggibile dallo strumento. La comparsa di sangue diluito all'interno della finestra di lettura può inoltre essere interpretata dalla macchina come un picco di assorbanza e può dunque essere confusa con una delle due bande presenti sulla porzione di nitrocellulosa. Infine, la comparsa di sangue sulla nitrocellulosa, oltre ad essere un risultato estetico non gradevole, renderebbe più difficile la lettura del risultato da parte dell'utente.

Considerando invece i risultati ottenuti sull'intensità della banda test, i dati evidenziano alcune differenze fra i casi considerati. Per prima cosa, il grafico appare suddiviso in due parti ben distinte. Le bande test dei campioni negativi si assestano infatti in corrispondenza di bassi valori di assorbanza, mentre le bande test dei campioni positivi si posizionano su valori più alti. Questo risultato è coerente con quello che ci si aspetterebbe, dal momento che il valore di

assorbanza, e di conseguenza la visibilità della banda, è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente all'interno del campione analizzato. Inoltre, la netta distinzione fra le assorbanze dei campioni positivi e dei campioni negativi rispecchia la differenza di visibilità fra le due condizioni a livello macroscopico. In entrambi i casi è comunque possibile notare una differenza fra i campioni trattati con il tappo capillare e la configurazione standard. I risultati ottenuti con il primo metodo sono infatti caratterizzati da una assorbanza mediamente più elevata sia nel caso dei campioni positivi che nel caso dei campioni negativi. Questo risultato può essere dovuto a differenti condizioni. In primo luogo, l'utilizzo di una pre-diluizione può aver indotto un maggior isolamento dell'antigene e delle altre componenti presenti in sospensione all'interno del campione di sangue, migliorando dunque quella che è l'affinità fra anticorpo e PSA. Questa teoria sembrerebbe dimostrata in particolare dal valore medio di assorbanza delle bande test dei campioni negativi i quali, pur essendo caratterizzati da ugual concentrazione di PSA, presentano una evidente differenza fra loro. La pre-diluizione infatti potrebbe aver aumentato anche l'affinità fra anticorpi e cross-interferenti presenti nel sangue, aspetto che va ad incidere negativamente sul test dal momento che potrebbe indurre un aumento del numero di falsi positivi. Tuttavia, facendo sempre riferimento ai campioni negativi trattati con tappo capillare, è facile osservare come essi siano caratterizzati da una deviazione standard molto ampia e di conseguenza, ipotizzando di ampliare la popolazione statistica, si potrebbe verificare una maggiore sovrapposizione fra le curve di negativi. Bisogna inoltre ricordare che, come mostrato dalla Figura 47, nel caso di un volume di 120 μ L di soluzione alcune membrane presentano una colorazione di background che può essere stata scambiata per una banda test e può aver generato di conseguenza una distribuzione anomala dei risultati. In secondo luogo, ricordando che i campioni positivi utilizzati con il tappo capillare sono stati trattati in modo da essere caratterizzati da una maggiore concentrazione di antigene, la differenza in termini di assorbanza potrebbe essere giustificata dalla presenza di una maggiore quantità di antigene depositato sulla membrana reattiva. Infatti, nonostante alla fine del processo di diluizione la concentrazione di PSA sia teoricamente la stessa fra una configurazione e l'altra, all'interno del tappo potrebbe essere rimasto un certo volume di sangue residuo che, essendo ad una concentrazione più elevata, potrebbe aver aumentato la quantità di antigene rilasciato sulla striscia. Questo potrebbe aver portato la concentrazione di PSA ad un valore superiore rispetto ai 7 ng/mL ipotizzati.

3.4.2 Test IgE totali

Coerentemente con quanto visto nel caso del test per il PSA, anche per il test sulle IgE totali è stata verificata la corretta funzionalità delle membrane reattive prodotte e sono stati calcolati i valori di assorbanza della banda di controllo e della banda di test in condizioni standard.

In questo caso, è stato utilizzato lo stesso metodo di controllo, ovvero i campioni negativi sono stati simulati depositando 90 μL di diluente sulla membrana, mentre i positivi sono stati simulati depositando 60 μL di diluente e 30 μL di diluente all'interno del quale viene sospesa, con un rapporto di diluizione 1:10, una soluzione contenente IgE totali ad alta concentrazione (6750 UI/mL). Qui di seguito sono riportate invece le immagini di due test effettuati su un campione di sangue positivo e un campione negativo, dalle quali è possibile subito notare come l'intensità delle bande sia inferiore rispetto al test per PSA (Figura 48).

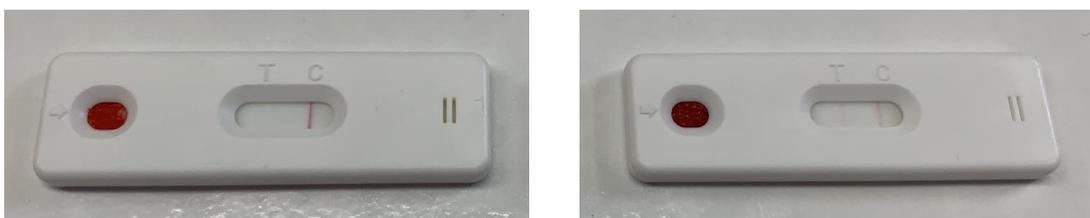


Figura 47: Rappresentazione dell'intensità delle bande di un test per IgE totali rispettivamente di un campione negativo e positivo.

Questa condizione è dovuta al fatto che, essendo le IgE molto più concentrate del PSA, è necessaria una concentrazione di oro inferiore per individuare correttamente l'antigene all'interno del sangue. Questa scelta progettuale si riflette sulla creazione di una soluzione di oro colloidale caratterizzata da una colorazione tenue. Per quanto riguarda invece i dati di assorbanza relativi al test per IgE, i risultati sono elencati nella tabella sottostante (Tabella 9) ed essi mostrano chiaramente quanto appena descritto in merito alla concentrazione della soluzione di oro colloidale.

CAMPIONI NEGATIVI CONFIGURAZIONE STANDARD				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	114,7	2,4	2,1	0,3
90	111,7	3,9	2,5	1,3
120	119,1	4,5	3,3	0,9

CAMPIONI POSITIVI CONFIGURAZIONE STANDARD				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	111,9	5,2	12,4	1,7
90	71,7	3,6	24,6	2,9
120	132,2	10,1	19,1	2,8

Tabella 9: Tabelle riassuntive dei valori di assorbanza ottenuti sul test standard per IgE.

Anche il test per IgE totali non prevede l'utilizzo di una pre-diluizione e il cut-off di riferimento è impostato ad un valore di 100 UI/mL di sangue. Per questo motivo, i campioni positivi sono stati simulati impostando la concentrazione di IgE totali pari a 150 UI/mL ed esattamente come nel caso del test per PSA, è stata calcolata la quantità di immunoglobuline da aggiungere al campione di sangue utilizzato in modo da poter riprodurre tale concentrazione anche nel caso di un test in pre-diluizione. Anche in questo caso non è stato possibile quantificare la concentrazione di IgE totali presenti nel campione di sangue donato, dunque è stato utilizzato come base un campione di sangue negativo dotato di valori di assorbanza talmente bassi da poter essere considerati trascurabili. I risultati ottenuti in questo caso sono riportati nelle tabelle seguenti (Tabella 10):

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	153,43	20,70	6,64	1,30
90	153,68	12,86	7,02	1,38
120	148,82	10,65	6,40	2,40

CAMPIONI POSITIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	115,09	2,85	17,00	3,91
90	95,97	6,81	20,97	3,28
120	149,00	14,31	18,12	4,06

Tabella 10: Tabelle riassuntive dei valori di assorbanza ottenuti utilizzando il tappo capillare sul test per IgE totali.

Infine, i dati complessivi sono stati raggruppati nei seguenti grafici per effettuare dei confronti diretti fra le varie configurazioni (Grafico 7):

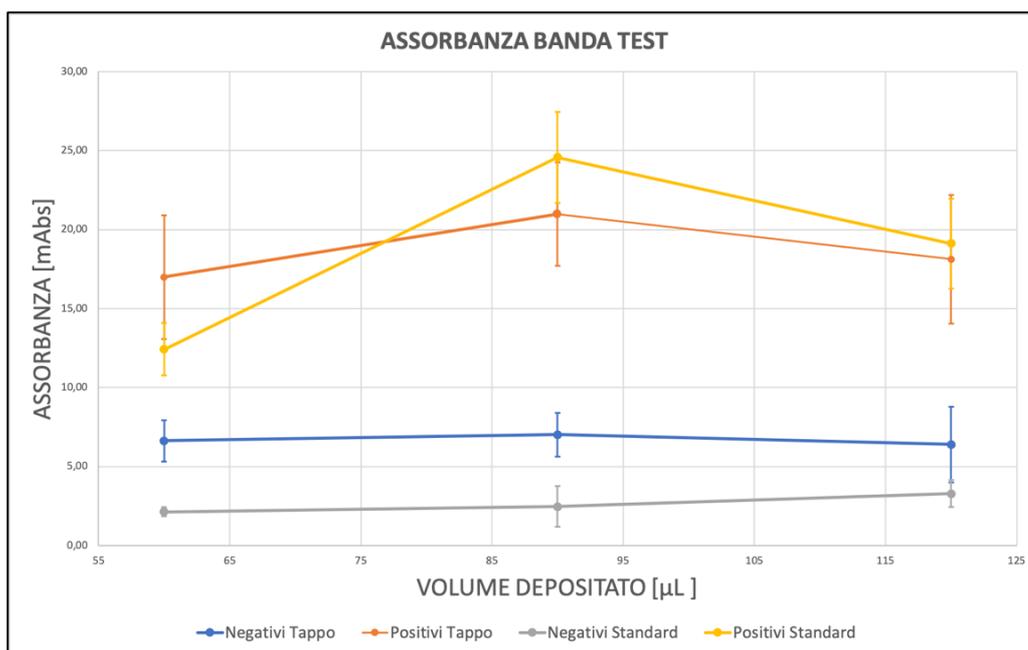
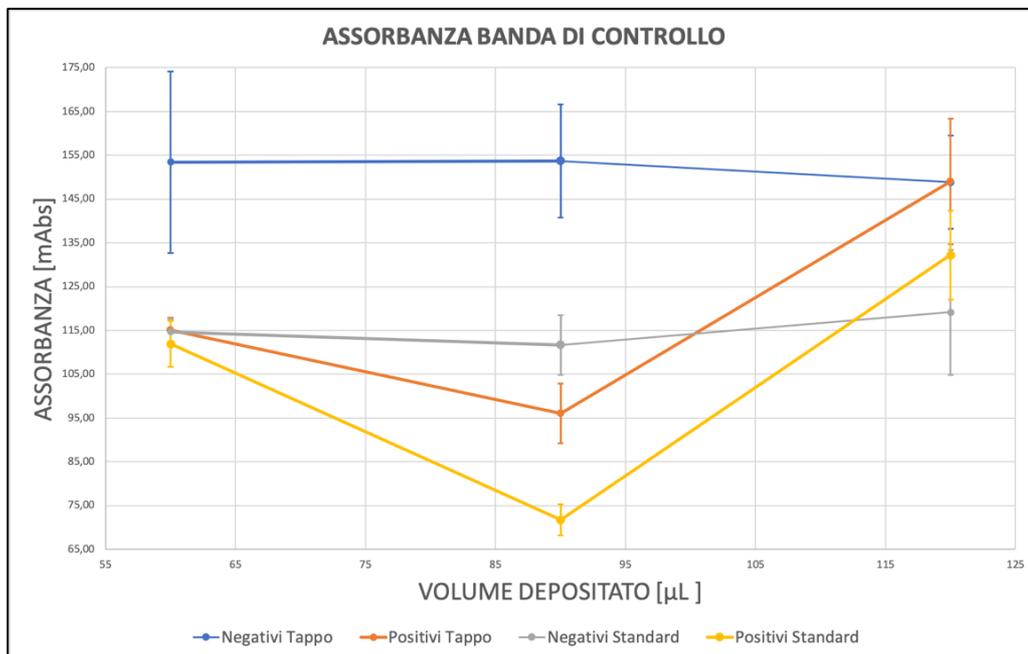


Grafico 7: Grafici relativi ai valori di assorbanza rispettivamente della banda di controllo e della banda test per IgE totali.

Come è possibile notare dai dati a disposizione, i valori medi delle assorbanze in generale sono molto più bassi rispetto al caso del test per PSA e questo, come già anticipato, è dovuto ad una concentrazione di oro colloidale più bassa. Dopodiché, analizzando per prima cosa la distribuzione delle assorbanze delle bande di controllo, è possibile notare come per volumi di soluzione pari a 30 μL e 120 μL tali valori siano molto simili fra loro, mentre nel caso di 60 μL i campioni positivi siano caratterizzati da una brusca decrescita. Tuttavia, anche in questo caso è possibile affermare che le bande di controllo siano dotate di un'intensità omogenea fra le varie condizioni. Inoltre, i dati mostrano come il valore medio delle assorbanze resti stabile al variare del volume di soluzione utilizzata e ciò può essere spiegato dal fatto che, nonostante un potenziale aumento del flusso di nano-particelle sulla banda di controllo, la bassa concentrazione fa' in modo che tale aumento non produca variazioni nettamente visibili. Considerando ora le bande test, anche in questo caso il grafico risulta essere suddiviso in due parti nettamente distinte. Troviamo infatti i campioni negativi posizionati su bassi valori di assorbanza e i campioni positivi su valori più elevati. La differenza presente fra questi dati testimonia il fatto che campioni positivi e negativi possano essere distinti gli uni dagli altri anche visivamente. Confrontando i risultati ottenuti utilizzando il tappo capillare e la configurazione standard, anche in questo caso i test che sono stati trattati con il primo metodo sono caratterizzati da bande più intense, anche se con una differenza meno netta rispetto alla situazione precedente. Anche in questo caso, la maggiore intensità potrebbe essere dovuta sia alla maggiore concentrazione di IgE utilizzata per replicare il campione positivo in pre-diluizione, sia all'aumento di affinità indotto dalla pre-diluizione stessa. Infine, la maggiore uniformità della distribuzione può essere dovuta alla composizione stessa dell'oro colloidale il quale, come già specificato, è caratterizzato da una concentrazione più bassa di immunoglobuline.

3.5 Sperimentazione chip capillare

La seconda configurazione analizzata in questa fase sperimentale è quella che è stata indicata con il nome di chip capillare nei precedenti paragrafi. Questo dispositivo è stato ideato immaginando tale componente come un'estensione della cassetta già esistente nel kit attualmente utilizzato. Anche in questa configurazione sono presenti tre canali i quali, per poter contenere lo spessore del chip, sono stati progettati con una sezione resistente variabile. Nello specifico, il raggio iniziale è stato impostato pari a 1mm mentre il secondo raggio, ovvero quello che si affaccia sulla valvola capillare, è pari a 0.5 mm per i motivi già evidenziati nei paragrafi precedenti. Per sbloccare la valvola capillare, il diluente viene depositato in questo

caso all'interno del pozzetto e, scorrendo nel canale principale, è in grado di trascinare con sé il volume di sangue bloccato. Alla fine di questo dispositivo, è presente uno gradino di 0.3mm che garantisce l'inserimento della membrana reattiva all'interno della configurazione. Dal punto di vista delle dimensioni, il canale principale è caratterizzato da una larghezza di 5mm e uno spessore di 0.8mm, dimensioni che sono state selezionate poiché permettono di posizionare correttamente la membrana reattiva all'interno della configurazione.

Ovviamente, il primo esperimento effettuato è stato quello che permette di determinare l'efficienza di progettazione del dispositivo. Nello specifico, è stata valutata la capacità della valvola capillare di prelevare solamente il volume di sangue richiesto. Come si può osservare nella seguente immagine (Figura 49), la configurazione è in grado di mantenere all'esterno dei tre canali il volume di sangue in eccesso rispetto ai 30 μ L su cui è stato tarato il test.



Figura 48: Immagine laterale e frontale del dispositivo che mostrano la capacità della valvola capillare di trattenere solo il volume di sangue necessario per il test.

Successivamente, è stata sperimentata la funzionalità di questa configurazione sia su test per PSA che su test per IgE ed è stata confrontata con i risultati ottenuti in precedenza sulle configurazioni standard.

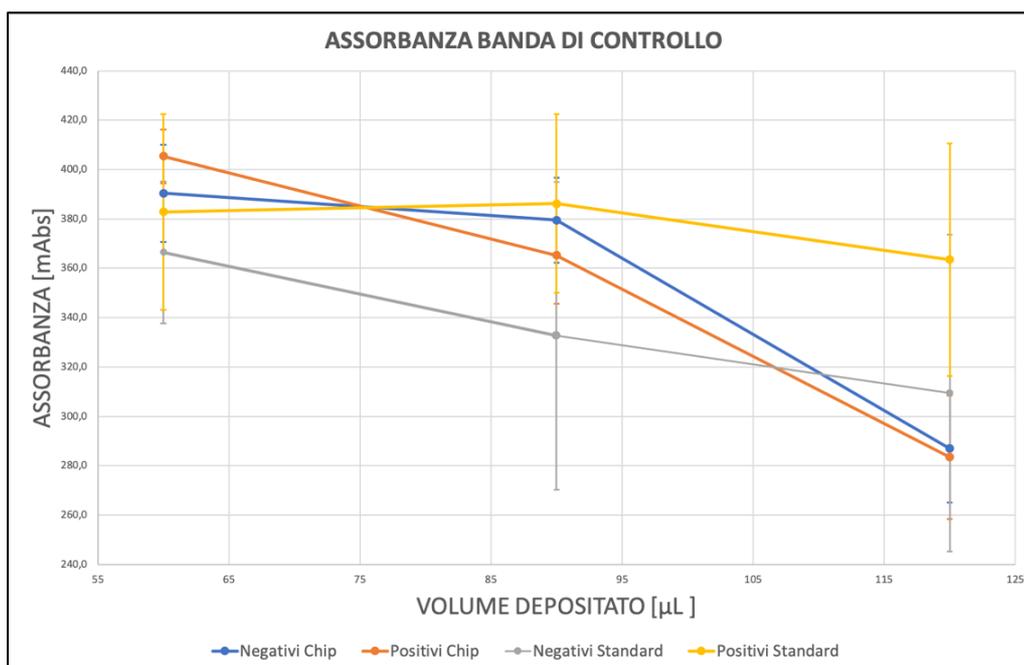
3.5.1 Test per PSA

All'interno di questa configurazione non è prevista una pre-diluizione, dunque non è necessario simulare un campione positivo andando a concentrare eccessivamente l'antigene all'interno del campione di sangue utilizzato. Partendo sempre da un campione di sangue femminile, per avere un'uniformità fra le configurazioni sperimentate anche in questo caso i campioni positivi sono stati realizzati impostando la concentrazione di PSA attorno ad un valore di 7 ng/mL di sangue. Tuttavia, per una questione di tempistiche, sono stati considerati solamente tre campioni per ogni tipologia di condizione. I risultati ottenuti sono stati riassunti nella tabella seguente (Tabella 11) e il loro andamento è stato infine confrontato con i dati ottenuti utilizzando la configurazione standard (Grafico 8) ed elencati nei precedenti paragrafi.

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	390,4	19,7	0,7	0,7
90	379,5	17,3	2,9	0,9
120	286,9	21,9	3,7	1,2

CAMPIONI POSITIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μL]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	405,35	10,87	63,20	9,38
90	365,27	19,69	87,70	8,07
120	283,47	24,98	99,07	12,23

Tabella 11: Tabelle riassuntive dei dati ricavati durante l'analisi di assorbanza di campioni positivi e negativi al test per PSA.



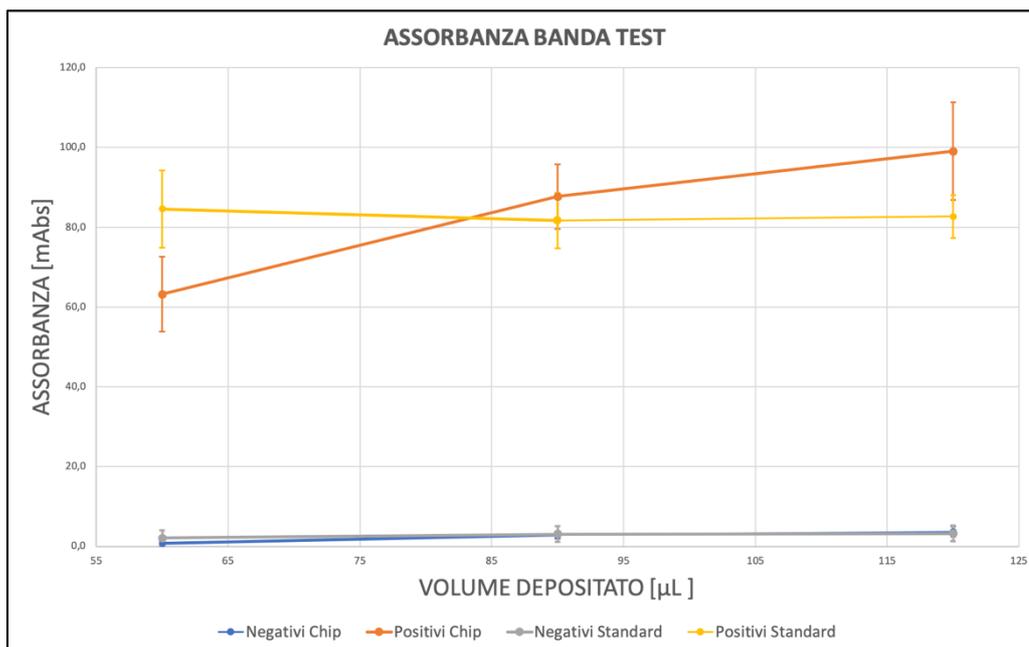


Grafico 8: Grafici che mostrano i valori di assorbanza delle bande di controllo e delle bande test dei campioni analizzati in funzione del volume di soluzione considerato.

Considerando i valori di assorbanza delle bande di controllo, fatta eccezione per la curva dei positivi standard che intercetta un valore di assorbanza elevato anche nel caso di 120 µL di soluzione, tutte le curve sono caratterizzate da un andamento decrescente all'aumentare del volume di soluzione depositato sulla striscia e i loro valori medi possono essere considerati confrontabili gli uni con gli altri. Anche in questo caso inoltre, è opportuno sottolineare come l'andamento dei campioni positivi standard sia caratterizzato da barre di errore elevate, dunque non è esclusa la possibilità che, aumentando il numero di campioni trattati, la distribuzione dei valori di assorbanza si avvicini all'andamento riscontrato negli altri casi. Tale condizione è concorde con i risultati ottenuti fino a questo punto della trattazione. Facendo riferimento invece all'andamento dell'intensità delle bande test, appare evidente come le curve dei negativi siano praticamente identiche fra loro, mentre le curve dei positivi risultano essere leggermente diverse, seppure l'andamento generale sia simile. Questa condizione può essere dovuta alla somiglianza presente fra questa configurazione e quella standard, aspetto non evidenziabile ad esempio nel caso del tappo capillare. Nello specifico, i campioni positivi ottenuti attraverso il chip sono caratterizzati da valori medi di assorbanza più bassi per volumi di soluzione pari a 60 µL. Questo aspetto può essere spiegato considerando il fatto che nella configurazione standard il sangue e la soluzione diluente vengono depositati direttamente sulla striscia, mentre nella nuova configurazione devono attraversare un canale con una lunghezza pari a circa 1 cm prima di giungere alla membrana reattiva. Questa ultima situazione può aver indotto un ristagno di sangue diluito all'interno di tale canale, andando a ridurre il

volume di campione utilizzabile per l'analisi. Inoltre, lo scarso volume può aver indotto sforzi di taglio agenti sulla valvola capillare per troppo poco tempo, limitando ulteriormente il volume di sangue effettivamente rimosso dai tre canali e in grado di raggiungere la membrana. Questa considerazione è ulteriormente avvalorata dal fatto che la banda di controllo in questi casi impiega quasi un minuto a comparire sulla membrana reattiva, risultato che evidenzia la lentezza del moto della soluzione all'interno del dispositivo. Nel caso di 60 μ L e 120 μ L invece, il volume totale potrebbe essere sufficiente a far entrare subito in contatto la soluzione complessiva con la membrana reattiva, rendendo quindi il flusso del campione molto più rapido dal momento che verrebbe utilizzata fin da subito l'azione di pompa capillare della striscia. Infine, è interessante sottolineare come le intensità delle bande test siano fra loro altamente confrontabili a parità di condizione.

3.5.2 Test per IgE totali

Dal momento che non è prevista nemmeno in questo caso una pre-diluzione, i campioni di sangue positivi sono stati riprodotti sospendendo la soluzione contenente le IgE all'interno del campione di sangue negativo a disposizione. Anche in questo caso, per uniformità di dati e procedure, la concentrazione dei campioni positivi è stata impostata attorno a valori di 150 UI/mL di sangue. I dati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle (Tabella 12) e il loro andamento è riportato nei successivi grafici (Grafico 8).

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μ L]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	80,27	1,83	1,83	1,63
90	120,68	8,27	8,27	0,76
120	130,32	9,13	9,13	1,16

CAMPIONI POSITIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μ L]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	112,33	1,38	19,80	4,55
90	122,80	14,87	35,63	9,15
120	126,37	6,42	55,62	6,01

Tabella 12: Tabelle contenenti i dati relativi al chip capillare applicato al test per IgE totali, rispettivamente per campioni negativi e campioni positivi.

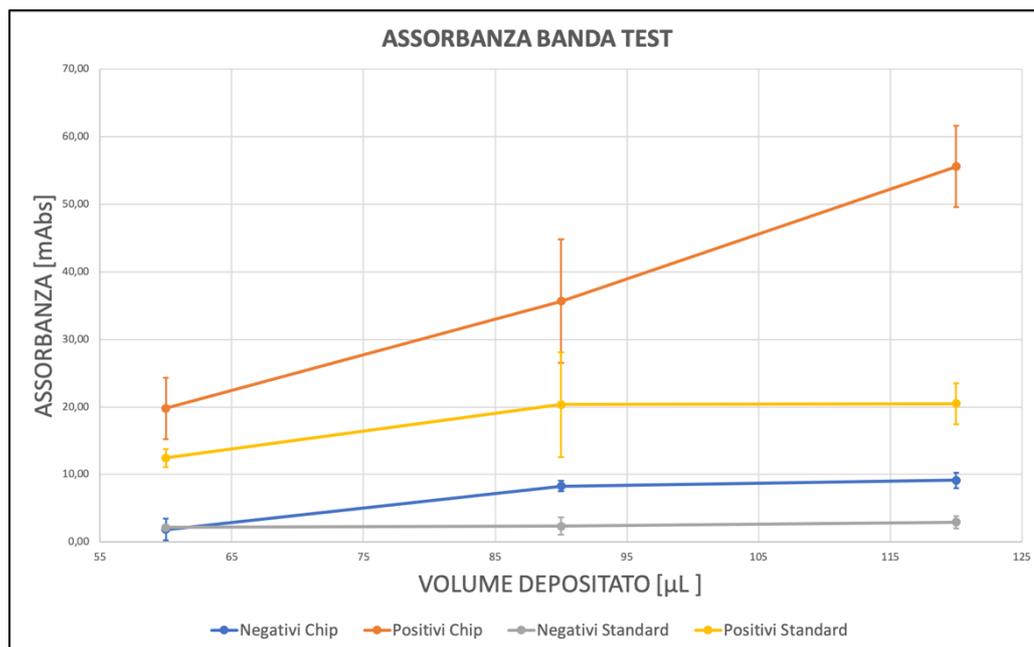
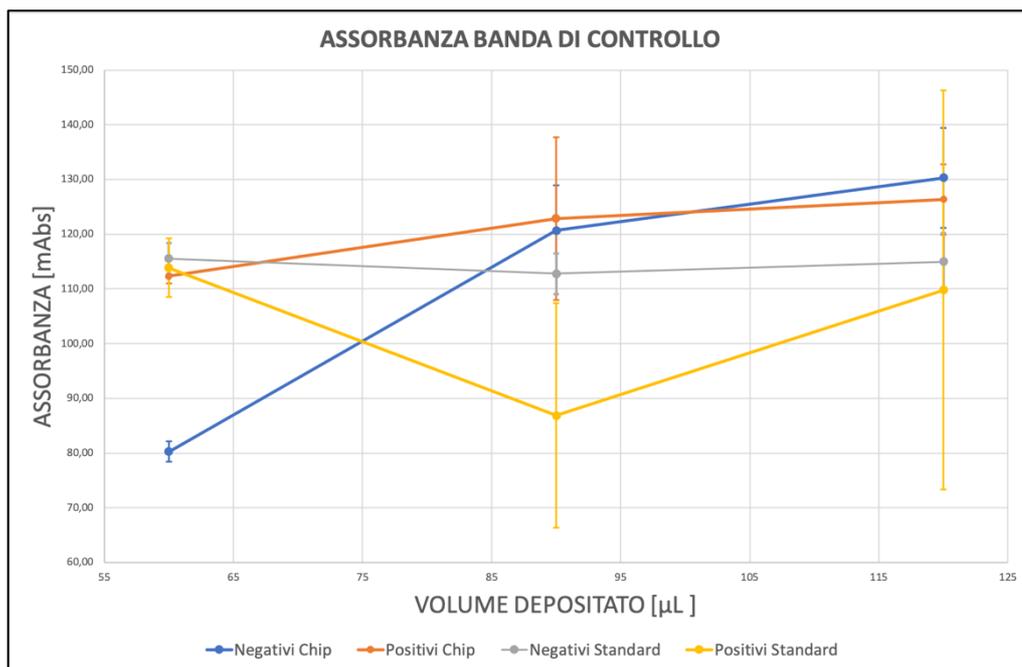


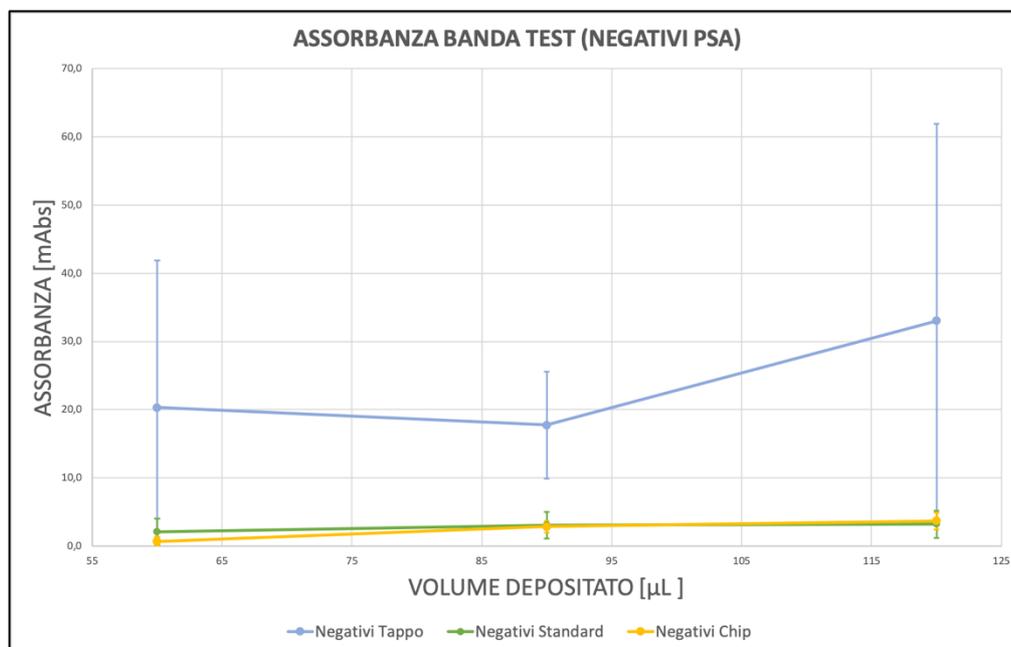
Grafico 9: Grafici che mostrano l'andamento della banda di controllo e della banda test nelle configurazioni analizzate.

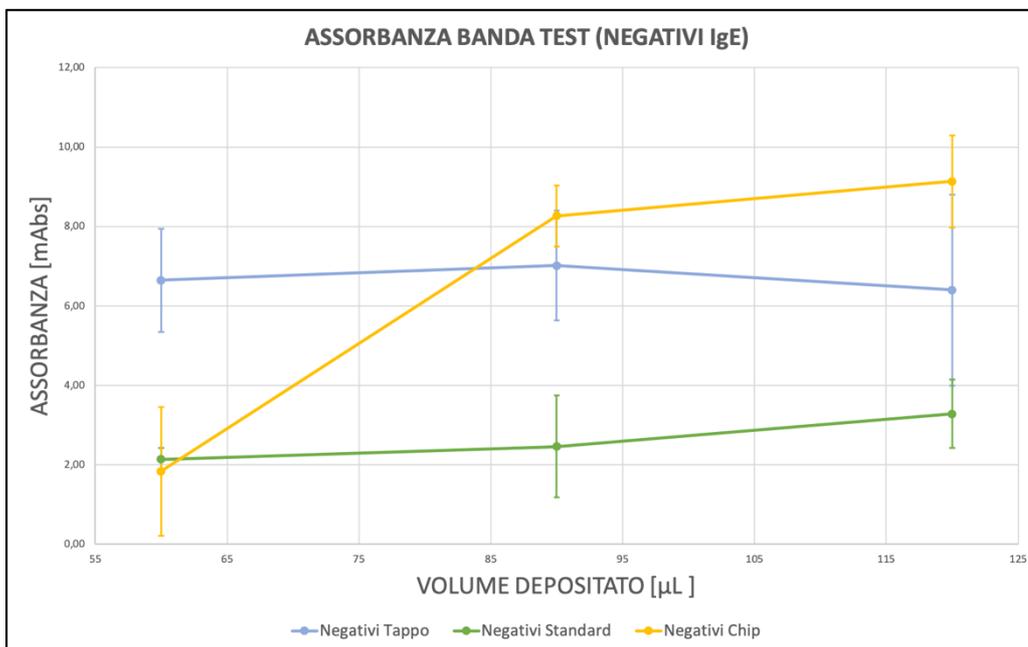
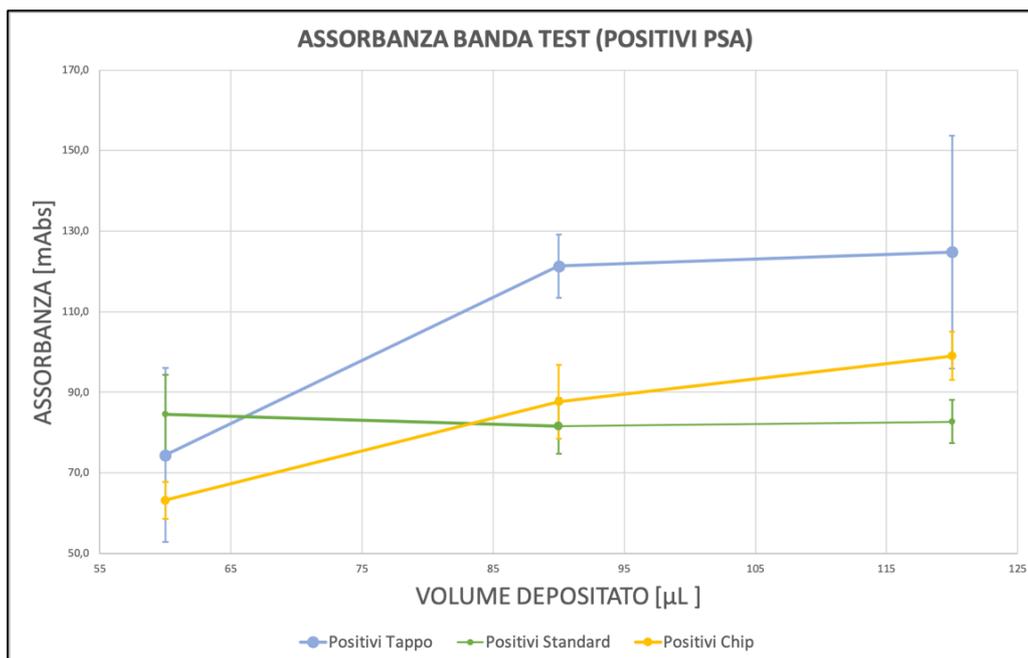
Anche in questo caso, le bande di controllo sono caratterizzate da andamenti simili fra loro dal punto di vista dei valori di assorbanza, fatta eccezione per i campioni negativi trattati con il chip capillare. In questo caso, per bassi valori di volume, il valore di assorbanza rimane molto basso. Ciò può essere dovuto alla difficoltà con cui la soluzione scorre attraverso la membrana e il canale prima di essa a causa dello scarso volume utilizzato. Per quanto riguarda invece l'andamento dei positivi standard, il loro valore medio si distacca dal comportamento osservabile negli altri casi, ma le barre di errore mostrano come vi sia comunque la possibilità che tale andamento sia giustificabile dalle poche ripetizioni effettuate.

Per quanto riguarda le bande test invece, gli andamenti dei campioni negativi sembrano molto simili fra loro, mentre nel caso dei campioni positivi si ha una differenza visibile, la quale risulta essere più evidente nel caso di un volume di soluzione pari a 120 μL , condizione in cui il valore di assorbanza relativo alla nuova configurazione è molto più elevato.

3.6 Conclusioni

Infine, si è voluto confrontare direttamente le due configurazioni sperimentate. Qui di seguito sono riportati i grafici contenenti gli andamenti dei valori di assorbanza dei campioni positivi e negativi (Grafico 9).





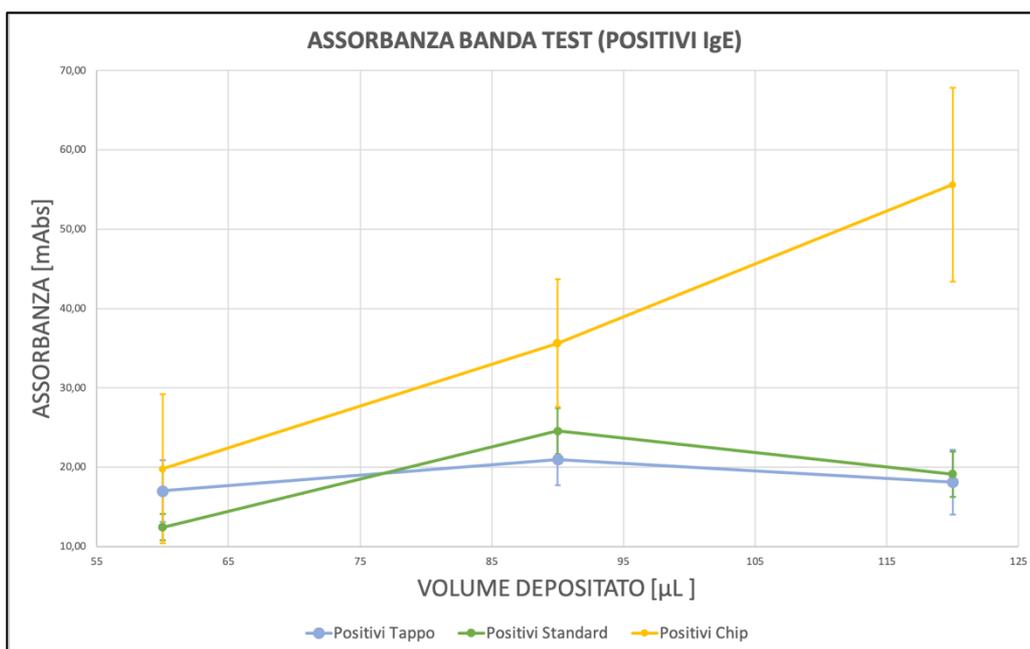


Grafico 10: Grafici relativi ai confronti fra i valori di assorbanza del test standard e quelli ottenuti con le due nuove configurazioni.

I dati appena mostrati evidenziano quanto detto finora. In particolare, è possibile notare come mediamente i valori di assorbanza ottenuti con il tappo capillare siano più elevati rispetto ai dati ricavati con le altre due configurazioni. Tuttavia, come già specificato nei precedenti paragrafi, è necessario approfondire il contributo della composizione dei campioni positivi sull'intensità della banda test per poter affermare con certezza che tale configurazione permetta di ottenere dei risultati più visibili. Inoltre, la presenza di una banda più intensa anche nel caso dei campioni negativi non è necessariamente da considerarsi un risultato positivo, dal momento che ciò potrebbe portare alla generazione di falsi positivi. Facendo riferimento al test per PSA ad esempio, data la sua concentrazione di oro colloidale una banda è considerata ben visibile al di sopra di valori pari a 40 mAbs, dunque nel caso di 120 µL di soluzione depositati sulla membrana può accadere in alcuni casi che l'intensità della banda test possa relativamente alta e il risultato possa essere interpretato come un positivo debole. Nel caso del test per IgE invece, la banda test è considerata ben visibile per valori di assorbanza maggiori di 15 mAbs, dunque dai risultati è possibile notare come i campioni negativi siano al di sotto di tale valore e non si abbia il rischio di avere dei falsi positivi.

Per confrontare in maniera definitiva le due configurazioni, si è deciso di utilizzare una tabella riassuntiva che permetta di verificare la loro compatibilità con i requisiti di progetto elencati nei paragrafi precedenti (Tabella 13).

CONFRONTO CON REQUISITI DI PROGETTO		
REQUISITO DI PROGETTO	TAPPO CAPILLARE	CHIP CAPILLARE
Eliminazione micro-pipetta	In entrambi i casi, è stata individuata una configurazione alternativa all'utilizzo della micro-pipetta capillare, aspetto che garantisce anche la diminuzione del numero dei componenti.	
Meccanismo di controllo di volume	In entrambi i casi, è stata individuata una configurazione che sfrutta la presenza della valvola capillare a due livelli e che garantisce il controllo di volume di sangue in maniera passiva.	
Brevettabilità	Avendo utilizzato alla base della progettazione un principio ben noto in letteratura è possibile ricavare un modello di utilità ma non un brevetto. Inoltre, questo aspetto è da approfondire ulteriormente dopo aver monitorato nuovamente la letteratura brevettuale.	
Lavorazione per stampaggio ad iniezione	Dal momento che entrambe le configurazioni si basano su modifiche di componenti già esistenti e realizzati con questo processo di lavorazione, si suppone la possibilità di poter fare lo stesso con i nuovi componenti sperimentati.	
Contenimento costi	Nonostante l'eliminazione di un componente dal kit, è opportuno ricordare come sia necessario un cambio di materiale per poter svolgere in efficace il test, dunque è necessario valutare quale delle due modifiche sarà più impattante sul costo totale.	
Sicurezza del kit	In questo caso, la sicurezza della configurazione contenente il tappo capillare è maggiore rispetto alla configurazione standard, dal momento che il campione di sangue prelevato rimane confinato all'interno del flacone ed in forma diluita.	In questo caso, la sicurezza per l'utilizzatore rimane invariata rispetto alla configurazione standard, dal momento che il volume di sangue prelevato resta comunque esposto sul componente.
Tempo del risultato	In entrambi i casi, il risultato del test è visibile all'interno della finestra di tempo prevista per la configurazione standard.	
Impatto su attendibilità del test	Il tappo capillare, come mostrato attraverso la sperimentazione, è caratterizzato da alcuni aspetti critici e che devono essere analizzati in maniera più approfondita.	Il chip capillare sembrerebbe essere caratterizzato da un funzionamento analogo al test standard. Tuttavia, è opportuno ampliare la popolazione campionaria per poter stabilire con certezza se il test è attendibile.

Mantenere processo di lavorazione	In entrambi i casi, le configurazioni sono un'estensione di componenti attualmente realizzati con tale processo, dunque si suppone che anche i nuovi dispositivi possano essere realizzati con tale processo. Tuttavia, anche questo aspetto è da approfondire ulteriormente.
--	---

Tabella 13: Schema riassuntivo dello stato delle due configurazioni analizzate rispetto ai requisiti di progetto fissati all'inizio della trattazione.

3.7 Sviluppi futuri

Per comprendere effettivamente l'efficacia delle configurazioni sperimentate e la possibilità di immettere sul mercato un dispositivo funzionante, le attività future che dovranno essere svolte possono essere riassunte con il seguente elenco:

- Valutazione degli effetti della coagulazione sull'efficienza del dispositivo;
- Sperimentazione su una popolazione campionaria più ampia composta da campioni realmente positivi;
- Sperimentazione su materiali da prodotto finito, come ad esempio PMMA e policarbonato;
- Adattabilità dei dispositivi al processo di stampaggio per iniezione;
- Valutazione della facilità di utilizzo da parte di un generico utente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Anon., 2008. An Analytic Solution of Capillary Rise Restrained by Gravity. *Jorunal of Colloid and Interface SCience*, Volume 320, pp. 259-263.
- [2] Anon., 2017. 3D capillary stop valves for versatile patterning inside microfluidic chips. *Analytica Chimica Acta*.
- [3] Candiani, G., 2019. *Corso di Bioreattori e Biotecnologie*. s.l.:s.n.
- [4] Ching, K., 2015. Lateral Flow Immunoassay. In: *ELISA*. s.l.:s.n., pp. 127-137.
- [5] Domingues, C. C. et al., 2009. Resistance of Human Erythrocyte Membranes to Triton X-100 and C12E8. *Journal of Membrane Biology*, Issue 227, pp. 39-48.
- [6] Dong M, W. J. M. Z. P.-S. H. Z. M. K. P. T. N. L. Y. R. C. L. F., 2017. Rapid and Low-Cost CRP Measurement by Integrating a Paper-Based Microfluidic Immunoassay with Smartphone (CRP-Chip). *Sensors*, 4(17).
- [7] Hitzbleck, M. et al., 2012. Capillary soft valves for microfluidics. *Lab on Chip*, Volume 11, pp. 1972-1978.
- [8] J, M. et al., 2004. *Sensor and Actuators*. s.l.:s.n.
- [9] Kozcula, K. & Gallotta, A., 2016. Lateral flow assay. In: *Essays in Biochemistry*. s.l.:s.n., pp. 111-120.
- [10] Leu, T. S. & Chang, P. Y., 2004. Pressure barrier of capillary stop valves in micro sample separators. *Elsevier*, Issue 115, pp. 508-515.
- [11] NanoComposix, 2018. Lateral Flow Assay Development Guide. Volume 14, pp. 1-41.

- [12] Olanrewaju, A., Beaugrand, M., Yafia, M. & Juncker, D., 2018. Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillary circuits. *Royal Society of Chemistry*.
- [13] Posthuma-Trumpie, G., Korf, J. & Van Merongen, A., 2009. Lateral Flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2(393), pp. 569-582.
- [14] Seemann, R. et al., 2005. Wetting morphologies at microstructured surfaces. *PNAS*, 102(6), pp. 1848-1852.
- [15] Smith, S. et al., 2016. *Micromachines*. 7(22).
- [16] Sugioka, K. et al., 2014. Femtosecond laser 3D micromachining: a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass. *Lab on Chip*, Volume 18, pp. 3447-3458.
- [17] Torrisi, L. & Scolaro, C., 2017. Blood Wettability of Haemocompatible Carbon-based Materials. *Journal of Advanced Chemical Engineering*, 7(2), pp. 1-6.
- [18] Tukmachev, V., Nedospasova, L., Zaslavskii, B. & Roghozin, S., 1979. Effect of sodium dodecyl sulfate on biological membranes. *Biofizika*, 24(1), pp. 55-60.
- [19] Weng, C. H., Kang, Y. L., Sung, Y. Y. & Gwo, B. L., 2011. A suction-type, pneumatic microfluidic device for liquid transport and mixing. In: *Microfluidics and Nanofluidics*. s.l.:Springer-Verlag, pp. 303-310.
- [20] Zimmermann, M., Hunziker, P. & Delamarche, M., 2008. Valves for autonomous capillary systems. Volume 5, pp. 395-402.

A.1 Script Matlab

A.1.1 Riempimento canale cilindrico

```
clear all
clc

format short

% PARAMETRI FISICI

mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido
ro = 1054;           % Densità fluido
g = 9.8;             % Forza peso
gamma = 62*10^-3;   % Tensione superficiale
teta = 0.976;       % Angolo di contatto
V = 3 * 10^-8;      % Volume totale

% PARAMETRI GEOMETRICI

r_v = [0.5:0.05:2]'.*10^-3; % Raggio canale
L_v = zeros(1,length(r_v));
dp_v = zeros(1,length(r_v));

% CICLO ITERATIVO PER CALCOLO DEI PARAMETRI

for i = 1:length(r_v)
    r = r_v(i);
    l = V / (pi*r^2); % Calcolo lunghezza canale
    L_v(i) = l;

    k_1 = ((2*gamma*cos(teta))/(2*pi*mu*r^2));
    k_2 = (ro*g*r)/(2*mu);

    A = k_1/(k_2)^2;
    B = k_2/k_1;

    t_fill = @(r) 0.7*(10^11)*abs(l/k_2 - A.*log(1 + B*l)); % Funzione tempo di riempimento
    dp = @(R) (4*gamma*cos(teta))/R; % Funzione pressione capillare
    t_v(i) = real(t_fill(r));
    dp_v(i) = dp(r);
end

% GENERAZIONE GRAFICI DI INTERESSE

figure(1)
plot(r_v, t_v);
title('Tempo di riempimento vs Raggio');
xlabel('Raggio [m]');
ylabel('Tempo di riempimento [m]');

figure(2)
plot(r_v, L_v);
title('Lunghezza canale vs Raggio');
xlabel('Raggio [m]');
ylabel('Lunghezza canale [m]');

figure(3)
plot(r_v, dp_v);
title('Pressione vs Raggio');
xlabel('Raggio [m]');
ylabel('Pressione [Pa]');
```

A.1.2 Riempimento canale rettangolare

```

clear all
clc

format short

% PARAMETRI FISICI
mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido
ro = 1054;          % Densità fluido
g = 9.8;           % Forza peso
gamma = 62*10^-3;  % Tensione superficiale
teta = 0.976;      % Angolo di contatto
V = 3 * 10^-8;     % Volume totale

% PARAMETRI GEOMETRICI

alfa = pi/2;        % Angolo di inclinazione del canale
w_v = [0.5:0.025:2.0]'.*10^-3; % Vettore larghezze canale
h_v = [0.5:0.025:2.0]*10^-3;   % Vettore spessori canale

% CICLO ITERATIVO PER CALCOLO DEI PARAMETRI
for i = 1:length(h_v)
    for j = 1:length(w_v)
        h = h_v(i);      % Spessore canale
        w = w_v(j);      % Larghezze canale
        l_v(i,j) = V/(w*h); % Calcolo lunghezza canale
        l = l_v(i,j);

        k_1 = ((h*gamma*cos(teta))/(6*mu));
        k_2 = ((w*ro*(h^2)*g*sin(alfa))/(24*mu*(w+h)));

        t_fill = @(h,w) (l/k_2) - A.*log(1 + B*l); % Funzione tempo di riempimento
        dp = @(h,w) (4*gamma*cos(teta)*(w+h))/(w*h); % Funzione pressione capillare
        dp_mat(i,j) = dp(h,w); % Matrice pressioni capillari
        t_fill_mat(i,j) = t_fill(h,w); % Matrice tempi di riempimento
    end
end

% GENERAZIONE GRAFICI DI INTERESSE

figure(1)
mesh(w_v, h_v, t_fill_mat);
title('Tempo di riempimento vs Dimensioni');
xlabel('Larghezza [m]');
ylabel('Spessore [m]');
zlabel('Tempo di riempimento [s]');

figure(2)
mesh(w_v, h_v, l_v);
title('Lunghezza canale vs Dimensioni');
xlabel('Larghezza [m]');
ylabel('Spessore [m]');
zlabel('Lunghezza canale [m]');

figure(3)
mesh(w_v, h_v, dp_mat);
title('Pressione vs Dimensioni');
xlabel('Larghezza [m]');
ylabel('Spessore [m]');
zlabel('Pressione [Pa]');

figure(4)
plot(h_v, diag(t_fill_mat));
title('Tempo di riempimento vs Dimensioni');
xlabel('Larghezza [m]');
ylabel('Tempo di riempimento [s]');

```