
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>ABSTRACT.....</i>	<i>2</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>2</i>
<i>Materiali e metodi.....</i>	<i>5</i>
<i>Risultati e discussione.....</i>	<i>7</i>
<i>Capitolo 1 INTRODUZIONE.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1 Prima Home Test.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2 L'autotest diagnostico.....</i>	<i>12</i>
1.2.1 Tecnologie di funzionamento e componenti.....	13
1.2.2 Kit Prima Home test.....	19
1.2.3 Costi e produzione.....	21
1.2.4 Criticità e problematiche.....	22
<i>1.3 Requisiti di Progetto.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4 Letteratura scientifica.....</i>	<i>25</i>
1.4.1 Micro-fluidica e capillarità.....	25
1.4.2 La valvola capillare.....	27
1.4.3 Dimensionamento di una valvola capillare ad un livello.....	30
1.4.4 Dimensionamento di una valvola capillare a due livelli.....	31

1.4.5 Modelli analitici di capillarità	34
1.5 Ricerca Brevettuale.....	35
1.5.1 Parole chiave e classificazione dei brevetti	35
1.5.2 Meccanismo di controllo del diluente.....	37
Capitolo 2 MATERIALI E METODI	39
2.1 Processo di prototipazione.....	39
2.1.1 Tecnologia SLA e resina foto-polimerizzante.....	40
2.1.2 Validazione processo di prototipazione.....	42
2.1.3 Equazioni.....	44
2.2 Sperimentazione in laboratorio	45
2.2.1 Validazione dimensionamento valvola capillare.....	46
2.2.2 Protocollo di confronto e validazione.....	47
2.2.3 Preparazione strisce reattive	48
2.2.4 Preparazione soluzione diluente.....	52
2.2.5 Prelievo campioni di sangue.....	52
Capitolo 3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	53
3.1 Validazione materiale e processo di prototipazione.....	53
3.2 Prove di tenuta della valvola ad un livello	57
3.3 Prove di tenuta valvole a due livelli	60
3.4 Sperimentazione tappo capillare	68
3.4.1 Test PSA.....	69
3.4.2 Test IgE totali	76
3.5 Sperimentazione chip capillare	80
3.5.1 Test per PSA.....	81
3.5.2 Test per IgE totali	84
3.6 Conclusioni.....	87
3.7 Sviluppi futuri.....	91
Bibliografia	93
APPENDICE	96

A.1 Script Matlab	96
A.1.1 Riempimento canale cilindrico	96
A.1.2 Riempimento canale rettangolare	97
A.2 Disegni meccanici	98
A.2.1 Chip capillare	98
A.2.2 Tappo capillare	99
A.3 Calcoli numerici	100
A.3.1 Simulazione dei campioni positivi nei test senza pre-diluizione.....	100
A.3.1 Simulazione dei campioni positivi nei test con pre-diluizione	101

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1: LOGO <i>PRIMA HOME TEST</i>	11
FIGURA 2: ALCUNI ESEMPI DEI PRODOTTI SVILUPPATI DA <i>PRIMA HOME TEST</i>	11
FIGURA 3: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'AUTOTEST DIAGNOSTICO PROTETTO DAL BREVETTO US6541277B1.	12
FIGURA 4: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL RICONOSCIMENTO DIRETTO ED UNIVOCO DI UN ANTIGENE SFRUTTANDO DUE DIVERSE IMMUNOGLOBULINE.	13
FIGURA 5: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DI UN LFA CON METODO SANDWICH.....	15
FIGURA 6: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DI UN LFA CON METODO COMPETITIVO.	15
FIGURA 7: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DI UN TEST COLORIMETRICO PER COLESTEROLO TOTALE..	16
FIGURA 8: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLE 5 COMPONENTI CHE COMPONGONO LA STRISCIA REATTIVA.	16
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.....	19
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.....	22
FIGURA 11: IMMAGINE DELLA MICRO-PIPETTA CAPILLARE.....	23
FIGURA 12: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DELLE DIMENSIONI DI UN CIRCUITO MICRO-FLUIDICO. ..	25
FIGURA 13: IMMAGINE DEL CIRCUITO REALIZZATO DA <i>WANG ET AL.</i> , IL QUALE È CARATTERIZZATO DALLA PRESENZA DI TRE STRATI IN MATERIALE DIFFERENTE.	26
FIGURA 14: SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE OTTENIBILE ATTRAVERSO UN CAMBIO DI MATERIALE.	27
FIGURA 15: SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE OTTENIBILE ATTRAVERSO UN CAMBIO DI SEZIONE GARANTITO DALL'INCROCIO FRA DUE CANALI PERPENDICOLARI.....	28

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.....	29
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	31
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.....	32
FIGURA 19: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA I DUE PRINCIPALI BREVETTI ISOLATI DURANTE LA RICERCA BREVETTUALE.	37
FIGURA 20: VISTE DEI DUE BREVETTI DECADUTI ED IPOTIZZATI IDONEI PER IL CONTROLLO DEL VOLUME DI DILUENTE.	38
FIGURA 21: SCHEMA RAPPRESENTATIVO DEL PROCESSO DI STEREOLITOGRAFIA.	39
FIGURA 22: IMMAGINE DELLA STAMPANTE FORM 2 REALIZZATA DA FORMLABS.....	40
FIGURA 23: IMMAGINE RELATIVA AL FORNETTO UV UTILIZZATO PER LA FASE FINALE DI POST-LAVORAZIONE DEI DISPOSITIVI STAMPATI IN 3D.	41
FIGURA 24: IMMAGINE DEL MICROSCOPIO <i>LEXT-OLS4100</i> , <i>OLYMPUS</i> UTILIZZATO PER LE ANALISI DI RUGOSITÀ SUPERFICIALE.	42
FIGURA 25: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA DUE GOCCE DI SANGUE DEPOSITATE SULLE LASTRE STAMPATE IN SLA. L'IMMAGINE MOSTRA GLI ANGOLI DI CONTATTO INDIVIDUATI E L'OTTENIMENTO DEL LORO VALORE NUMERICO ATTRAVERSO SOFTWARE <i>MATLAB</i>	43
FIGURA 26: SCRIPT <i>MATLAB</i> UTILIZZATO PER LA STIMA DELL'ANGOLO DI CONTATTO.	43
FIGURA 27: SCHEMI GEOMETRICI DELLE CONFIGURAZIONI CONSIDERATE NEI MODELLI ANALITICI DI RIEMPIMENTO DEI CANALI.	45
FIGURA 28: IMMAGINE RELATIVA AL LETTORE IMMUNO-CROMATOGRAFICO <i>HAMAMATSU PHOTONICS</i> , MODELLO <i>C10066-10</i>	47
FIGURA 29: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DI UN LAMINATO RISPETTIVAMENTE CON E SENZA <i>PAD</i> ASSORBENTE. L'IMMAGINE RIPORTA I LAMINATI UTILIZZATI E VENDUTI DALL'AZIENDA <i>MDI-MEMBRANE TECHNOLOGIES</i>	49
FIGURA 30: DETTAGLIO RELATIVO ALLE TRE POMPE UTILIZZATE DALL' <i>ISOFLOW DISPENSER</i> PER LA SEMINA DELLE STRISCE REATTIVE.....	49
FIGURA 31: IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DEL FUNZIONAMENTO DELLA <i>ISOFLOW DISPENSER</i>	50
FIGURA 32: RAPPRESENTAZIONE DI UNA NANO-PARTICELLA D'ORO RICOPERTA DI ANTICORPI.....	51
FIGURA 33: VISTA DEL DISPOSITIVO SU CUI SONO STATE EFFETTUATE LE PROVE DI RUGOSITÀ PER DETERMINARE L'IDONEITÀ DEL PROCESSO DI PROTOTIPAZIONE.	53

FIGURA 34: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA LA DISPOSIZIONE DEL PROTOTIPO ALL'INTERNO DEL PIANO DI STAMPA.	54
FIGURA 35: IMMAGINE SCATTATA ATTRAVERSO UN MICROSCOPIO OTTICO E CHE MOSTRA IL FORTE ORIENTAMENTO DELLA RUGOSITÀ SUPERFICIALE.	54
FIGURA 36: RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA MORFOLOGIA SUPERFICIALE SULLA BASE DEI DATI DI RUGOSITÀ OTTENUTI AL MICROSCOPIO OTTICO.	56
FIGURA 37: SEQUENZA RAPPRESENTANTE IL COMPORTAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE NELLA FASE DI RIEMPIMENTO.	59
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.	59
FIGURA 39: SCHEMA DEI DISPOSITIVI UTILIZZATI PER LA SPERIMENTAZIONE DEI PARAMETRI CHE INFLUENZANO IL FUNZIONAMENTO DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI.	60
FIGURA 40: IMMAGINI CHE TESTIMONIANO L'INEFFICIENZA DELLA VALVOLA CAPILLARE A DUE LIVELLI NEL CASO DI UN ΔH PARI A 500 μM	62
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	63
FIGURA 42: IMMAGINI RAPPRESENTATIVE DI A) TAPPO CAPILLARE E B) 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	66
FIGURA 43: IMMAGINE CHE MOSTRA LA CAPACITÀ DEL TAPPO CAPILLARE DI MANTENERE ALL'ESTERNO DELLA CONFIGURAZIONE IL VOLUME DI SANGUE IN ECCESSO.	68
FIGURA 44: IMMAGINI RELATIVE AL CONTROLLO QUALITÀ DELLE MEMBRANE REATTIVE.	69
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.	71
FIGURA 46: IMMAGINE CHE RAPPRESENTA IL LEAKAGE DI SANGUE DILUITO NEL CASO IN CUI VENGA DEPOSITATO UN VOLUME ECCESSIVO DI SOLUZIONE SULLA MEMBRANA. LE IMMAGINI FANNO RIFERIMENTO RISPETTIVAMENTE AD UN CAMPIONE POSITIVO ED UN CAMPIONE NEGATIVO.	74
FIGURA 47: RAPPRESENTAZIONE DELL'INTENSITÀ DELLE BANDE DI UN TEST PER IGE TOTALI RISPETTIVAMENTE DI UN CAMPIONE NEGATIVO E POSITIVO.	76
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.	80

FIGURA 49: IMMAGINE CHE MOSTRA FENOMENI DI FLUSSO RETROGRADO RISPETTO ALLA MEMBRANA REATTIVA NEL CASO DELLA DEPOSIZIONE DI 90 μL DI SOLUZIONE DILUENTE. 86

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1: PAROLE CHIAVE UTILIZZATE PER LA RICERCA BREVETTUALE SUI <i>DATABASE</i> DI RICERCA.	35
TABELLA 2: SCHEMA RIASSUNTIVO DEL PROCESSO CON CUI SONO STATI SUDDIVISI I BREVETTI INDIVIDUATI IN LETTERATURA.	36
TABELLA 3: TABELLA RAPPRESENTATIVA DELLA TIPOLOGIA DI SPERIMENTAZIONE AVVIATA IN QUESTA FASE, NELLA VIENE INDAGATA LA RELAZIONE FRA <i>ASPECT RATIO</i> E VOLUME DI SANGUE A PARITÀ DI ΔH	46
TABELLA 4: 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)....	55
TABELLA 5: TABELLA RIASSUNTIVA DELLE PROVE DI ANGOLO DI CONTATTO, CONTENENTE LE SOLUZIONI TESTATE E I DATI RELATIVI A MEDIA E DEVIATIONE STANDARD.	57
TABELLA 6: RACCOLTA DEI DATI OTTENUTI IN TERMINI DI ASSORBANZA SUI TEST EFFETTUATI UTILIZZANDO IL TAPPO CAPILLARE, RISPETTIVAMENTE SUI CAMPIONI NEGATIVI E POSITIVI.	70
TABELLA 7: DATI RELATIVI ALL'ASSORBANZA VALUTATA SUI TEST STANDARD.	72
TABELLA 8: TABELLE RIASSUNTIVE DEI VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTI SUL TEST STANDARD PER IGE.	77
TABELLA 9: TABELLE RIASSUNTIVE DEI VALORI DI ASSORBANZA OTTENUTI UTILIZZANDO IL TAPPO CAPILLARE SUL TEST PER IGE TOTALI.	77
TABELLA 10: TABELLE RIASSUNTIVE DEI DATI RICAVATI DURANTE L'ANALISI DI ASSORBANZA DI CAMPIONI POSITIVI E NEGATIVI AL TEST PER PSA.	81
TABELLA 11: TABELLE CONTENENTI I DATI RELATIVI AL CHIP CAPILLARE APPLICATO AL TEST PER IGE TOTALI, RISPETTIVAMENTE PER CAMPIONI NEGATIVI E CAMPIONI POSITIVI.	84
TABELLA 12: SCHEMA RIASSUNTIVO DELLO STATO DELLE DUE CONFIGURAZIONI ANALIZZATE RISPETTO AI REQUISITI DI PROGETTO FISSATI ALL'INIZIO DELLA TRATTAZIONE.	91

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.	30
EQUAZIONE 2: FORMULA CHE PERMETTE DI DETERMINARE IL MINIMO ANGOLO DI CONTATTO RICHIESTO PER CREARE UNA VALVOLA CAPILLARE AD UN LIVELLO.	31
EQUAZIONE 3: EQUAZIONE CHE DESCRIVE LA PRESSIONE CAPILLARE IN UN CANALE RETTANGOLARE IN SEGUITO AD UN CAMBIO DI SEZIONE IMPOSTO DALL'ANGOLO β	33
EQUAZIONE 4: EQUAZIONE RELATIVA AL BILANCIO DI FORZE AGENTI SU UN VOLUME DI FLUIDO CHE SCORRE IN UN CANALE.	34
EQUAZIONE 5: EQUAZIONI DIFFERENZIALI RELATIVE AL BILANCIO DI FORZE AGENTI SUL VOLUME DI FLUIDO NEL CASO DI GEOMETRIA CILINDRICA E RETTANGOLARE. IN ORDINE, SONO RIPORTATI IN ENTRAMBI I CASI I CONTRIBUTI DELLA FORZA CAPILLARE, DELLA FORZA DI ATTRITO VISCOSO E DELLA FORZA PESO.	44
EQUAZIONE 6: FORMULA CHE PERMETTE DI CALCOLARE L'ANGOLO LIMITE DI BAGNABILITÀ DELLA SUPERFICIE CHE LA GOCCIA DI FLUIDO PUÒ RAGGIUNGERE.	56
EQUAZIONE 7: FORMULAZIONE CHE DESCRIVE L'INCREMENTO DI VOLUME GENERATO DALLA COMPARSА DI UN MENISCO IN CORRISPONDENZA DI UNA VALVOLA CAPILLARE.	64

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.	32
GRAFICO 2: GRAFICI CHE MOSTRANO LE CURVE DI SUCCESSO RELATIVE ALLA TENUTA DELLA VALVOLA CAPILLARE IN FUNZIONE A) DELLA DIFFERENZA DI ALTEZZA DEI CANALI A CAVALLO DELLA VALVOLA E B) DELLE DIMENSIONI DEL CANALE RETTANGOLARE.	33
GRAFICO 3: GRAFICI BI-DIMENSIONALI IN CUI SONO RIPORTATI I VALORI DI A) PRESSIONE CAPILLARE E B) TEMPO DI RIEMPIMENTO DI UN CANALE CON SEZIONE RETTANGOLARE.	58
GRAFICO 4: 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	61
GRAFICO 5: CONFRONTO DEI TEMPI DI RIEMPIMENTO FRA CANALI CON SEZIONE CIRCOLARE E SEZIONE RETTANGOLARE. IN QUESTO CASO, I TEMPI RICAVATI SONO STATI INDIVIDUATI IPOTIZZANDO IL RIEMPIMENTO DI CIASCUN CANALE A PARTIRE DAL BASSO.	67
GRAFICO 6: GRAFICI CHE MOSTRANO L'ANDAMENTO DEI VALORI DI ASSORBANZA NEL CASO DI A) BANDE DI CONTROLLO E B) BANDE TEST.	73
GRAFICO 7: GRAFICI CHE MOSTRANO L'ANDAMENTO DEI VALORI DI ASSORBANZA NEL CASO DI A) BANDE DI CONTROLLO E B) BANDE TEST.	78
GRAFICO 8: GRAFICI CHE MOSTRANO L'ANDAMENTO DEI VALORI DI ASSORBANZA NEL CASO DI A) BANDE DI CONTROLLO E B) BANDE TEST.	82
GRAFICO 9: GRAFICI CHE MOSTRANO L'ANDAMENTO DELLA BANDA DI CONTROLLO E DELLA ANDA TEST NELLE CONFIGURAZIONI ANALIZZATE.	85
GRAFICO 10: GRAFICI RELATIVI AI CONFRONTI FRA I VALORI DI ASSORBANZA DEL TEST STANDARD E QUELLI OTTENUTI CON LE DUE NUOVE CONFIGURAZIONI.	89

ABSTRACT

INTRODUZIONE

La società *Prima Home Test* è un'azienda di diagnostica che sviluppa autotest medici sfruttando una tecnica chiamata *Lateral Flow Immunoassay*. Essa permette di garantire il riconoscimento univoco di uno specifico antigene posto all'interno di un campione biologico attraverso l'utilizzo di anticorpi. Questo processo è svolto sfruttando membrane reattive costituite da diverse componenti e sulle quali sono depositate tre soluzioni contenenti i suddetti anticorpi. La prima soluzione contiene nano-particelle d'oro saturate con anticorpi specifici per l'antigene e garantisce, oltre ad una sua prima marcatura, la formazione di una colorazione macroscopicamente visibile che permette di rilevare ad occhio nudo il movimento e la successiva immobilizzazione della specie di interesse. Le altre due soluzioni sono invece utilizzate per la realizzazione della banda test e della banda di controllo. La prima viene sfruttata per completare il riconoscimento univoco dell'antigene, mentre la seconda è semplicemente utilizzata come feedback visivo per testimoniare il corretto svolgimento del test. Il principio di funzionamento di questa tecnologia può essere schematizzato attraverso la seguente immagine (Figura 1):

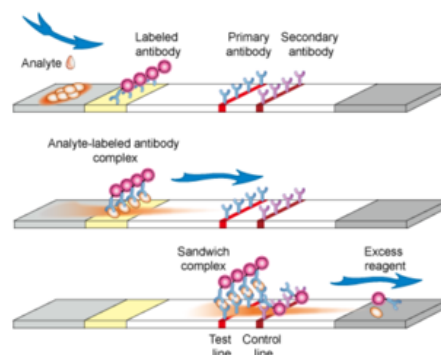


Figura 1: Schema di funzionamento di un LFA basato sul metodo sandwich

Questo processo appena descritto può essere svolto attraverso l'utilizzo di uno specifico kit venduto dall'azienda, il quale garantisce ad un generico utente la possibilità di svolgere in maniera completamente autonoma l'analisi del campione prelevato. Facendo particolare riferimento ai test su campione di sangue, la configurazione disponibile commercialmente permette all'utilizzatore di creare una lesione cutanea dalla quale prelevare il necessario volume di campione da analizzare. Esso viene poi depositato sulla membrana reattiva contenuta all'interno di una cassetta in HDPE, accompagnato anche dalla deposizione di un certo volume di soluzione diluente. Quest'ultima garantisce non solo di ottimizzare il moto del campione sulla striscia, ma permette anche di isolare in maniera più efficiente l'antigene, migliorandone l'affinità con gli anticorpi.



Figura 2: 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.

La precedente configurazione è tuttavia caratterizzata da alcune criticità, tra cui la numerosità dei componenti e l'impossibilità di prelevare volume di sangue necessario per il test in maniera precisa. Per questo motivo, la seguente trattazione si pone l'obiettivo di individuare una strategia che permetta di risolvere le due problematiche appena citate, tenendo conto tuttavia di come non debbano essere introdotti eccessivi aumenti di costi, eccessive variazioni nel processo produttivo ed incrementi di difficoltà di utilizzo. Infine, la nuova soluzione implementata dovrà presentare, se possibile, gli estremi per la formulazione di un brevetto o di un modello di utilità. Il primo passo per l'individuazione di una configurazione che rispetti le specifiche di progetto appena citate è la ricerca all'interno della letteratura scientifica. Facendo particolare riferimento alla micro-fluidica, è stato possibile individuare un meccanismo chiamato valvola capillare, il quale permette il blocco del fronte di un fluido in un punto predefinito. Tale condizione potrebbe dunque essere utilizzata come meccanismo passivo di controllo di volume del campione di sangue, il cui moto potrebbe essere successivamente ripristinato attraverso l'interazione di quest'ultimo con la soluzione diluente. In particolare, considerando il moto di un liquido all'interno di un canale, tale fenomeno è ottenibile sia attraverso il cambio delle proprietà di bagnabilità del materiale [13], sia attraverso una brusca variazione della sezione del condotto [14] (Figura 3).

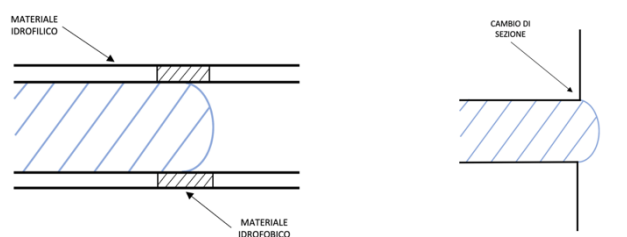


Figura 3: Immagini rappresentative delle due diffeenti tipologie di valvole capillari.

La seconda modalità di ottenimento del blocco di un fluido è stata reputata la più adatta agli scopi prefissati ed in particolare, essa può essere implementata sia generando un aumento di sezione caratterizzato dalla sola espansione in direzione laterale del canale, sia inducendo un aumento di entrambe le dimensioni caratteristiche del condotto. La prima tipologia di componente viene chiamata valvola capillare ad un livello ed è progettabile a patto di conoscere l'angolo di contatto fra il liquido in esame e il materiale utilizzato. Conoscendo questo dato è infatti possibile individuare il minimo angolo divergenete a cui è associato l'aumento della larghezza del condotto (Figura 4).

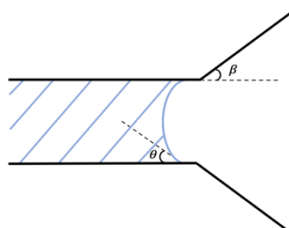


Figura 4: Schema geometrico della valvola capillare ad un livello [15].

La seonda tipologia di componente viene chiamata valvola capillare a due livelli, dal momento che l'incremento di sezione è garantito secondo lo schema seguente (Figura 5).

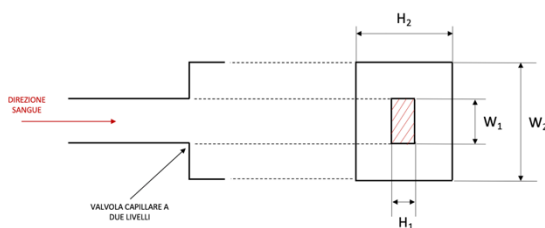


Figura 5: Schema geometrico di una valvola capillare a due livelli.

La letteratura analizzata suggerisce come tale configurazione debba essere progettata valutando l'influenza di diversi parametri, tra cui il volume di fluido che si vuole

immobilizzare, l'area della sezione del condotto di raccolta, il minimo incremento delle dimensioni caratteristiche del canale ed anche il valore dell'angolo divergenete del condotto. Infine, per determinare la possibilità di implementare effettivamente una configurazione di questo tipo è stata anlizzata la letteratura brevettuale. La ricerca è stata impostata cercando di isolare eventuali brevetti che fanno esplicitamente riferimento alla valvola capillare come meccanismo di controllo di volume. Nessuno dei brevetti al momento attivi protegge una configurazione di questo tipo, dunque questo componente può essere sviluppato per la realizzazione di un dispositivo che possa soddisfare i requisiti di progetto.

MATERIALI E METODI

La tecnica di prototipazione utilizzata nella fase sperimentale è la stereolitografia, processo che permette la polimerizzazione a strati di materiali fotosensibili a seguito di una stimolazione mediante fascio laser. Una volta realizzati i prototipi, è stata compiuta un'analisi della loro morfologia superficiale attraverso l'utilizzo di un microscopio laser confocale (Figura 6). I dati raccolti hanno il principale obiettivo di verificare l'idoneità del processo di stampa 3D nei confronti della sperimentazione in atto. In particolare, si vuole determinare se la rugosità formatasi sulla superficie dei dispositivi sia in grado di indurre modifiche di bagnabilità del materiale utilizzato.



Figura 6: immagini relative al microscopio e alla stampante 3D utilizzati nelle prime fasi della sperimentazione.

Questa analisi è stata completata valutando l'angolo di contatto assunto da determinati fluidi di interesse, tra cui il sangue. La determinazione del suo angolo di contatto si rende necessaria dal momento che tale parametro è fondamentale per il dimensionamento della valvola capillare ad un livello, la valutazione della pressione capillare sfruttata durante il suo prelievo e la stima dei tempi di riempimento dei canali di raccolta del campione. Quest'ultimo aspetto è stato valutato tramite il modello analitico di Lucas-Washburn, il quale si basa sul bilancio di forze agenti sul menisco di fluido in moto all'interno di un condotto. L'espressione di tale

equazione è stata opportunamente determinata per canali con geometria cilindrica e rettangolare (Equazione 1).

$$\begin{array}{l}
 \text{GEOMETRIA} \\
 \text{CILINDRICA} \\
 \\
 \text{GEOMETRIA} \\
 \text{RETTANGOLARE}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 4\gamma \cos(\theta)\pi R - 8\pi\mu h \frac{dh}{dt} \pm \pi R^2 \rho g \sin(\alpha)h = 0 \\
 \\
 4\gamma \cos(\theta)(w + s) - \frac{24(w + s)\mu}{h} h \frac{dh}{dt} \pm \rho w s g \sin(\alpha)h = 0
 \end{array}$$

Equazione 1: Espressione differenziale dell'equazione di Lucas-Washburn relativa a canali con sezione circolare e cilindrica.

Successivamente, i risultati ottenuti nella precedente fase di sperimentazione sono stati utilizzati per la progettazione di una valvola capillare ad un livello, il cui funzionamento è stato valutato verificando la capacità di tale valvola di accumulare all'interno del canale di raccolta solamente il volume di sangue desiderato. Per quanto riguarda la valvola capillare a due livelli invece, sono stati utilizzati dei prototipi dalla semplice geometria ma che permettono di valutare l'influenza di differenti parametri sul funzionamento del componente (Figura 7).

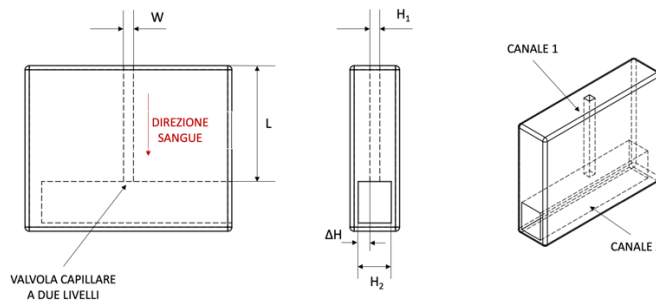


Figura 7: Rappresentazione schematica dei prototipi utilizzati per la sperimentazione della valvola capillare a due livelli.

Anche in questo caso, la funzionalità della valvola è stata valutata in base alla sua capacità di mantenere all'esterno del canale di raccolta il volume di sangue non necessario. La serie di esperimenti appena descritti permette di individuare i parametri di funzionamento ottimali per entrambe le tipologie di valvole. Una volta determinati, è stato possibile ideare due differenti configurazioni integrabili nel kit attualmente in uso e caratterizzate da un opportuno meccanismo di controllo di volume. Per valutare l'efficienza delle soluzioni progettate, esse sono state applicate a due test disponibili in azienda, ovvero quelli relativi al riconoscimento di PSA e IgE totali all'interno di un campione di sangue. Nello specifico, è stata verificata la capacità da parte delle nuove configurazioni di discriminare i campioni positivi da quelli negativi. Per fare ciò, è stato utilizzato un lettore immuno-cromatografico (Figura 8), il quale permette di rilevare il valore di assorbanza sia della banda di controllo che della banda test.



Figura 8: Immagine relativa al lettore immuno-cromatografico tilizzato.

Quest'ultima in particolare è di fondamentale interesse nella trattazione, dal momento che è caratterizzata da un'intensità proporzionale alla quantità di antigene immobilizzato sulla membrana reattiva. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli ricavati nel caso della configurazione standard.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi superficiale dei primi prototipi stampati ha permesso di determinare come essi siano caratterizzati da una struttura superficiale schematizzabile nel modo seguente (Figura 9).

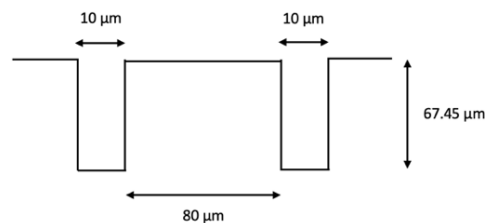


Figura 9: Schema della morfologia superficiale ottenuta durante il processo di prototipazione.

Considerando un opportuno modello analitico presente in letteratura [18], è possibile affermare come una rugosità di questo tipo non sia in grado di indurre modifiche di bagnabilità sulla superficie dei dispositivi, motivo per cui il processo di prototipazione è stato ritenuto idoneo per la sperimentazione in atto. Successivamente, sono stati ricavati i valori di angolo di contatto di alcune soluzioni di interesse, tra cui il sangue. Quest'ultimo, una volta depositato sulla superficie del materiale, assume un angolo di contatto pari a circa 59.9° . Tale valore, oltre a dimostrare un comportamento idrofilico del materiale, ha permesso di dimensionare opportunamente la valvola capillare ad un livello, la quale è stata successivamente sperimentata. Qui di seguito è riportata una sequenza di immagini che mostra i risultati ottenuti relativamente a questo dispositivo (Figura 10).

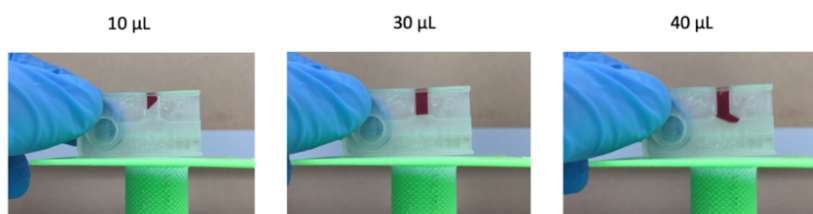


Figura 10: Sequenza di immagini che dimostra l'incapacità della valvola capillare di trattenere il corretto volume di sangue per cui è stato progettato il canale.

Un'analisi più attenta della letteratura scientifica ha permesso di evidenziare come il comportamento appena evidenziato sia da imputare principalmente alle dimensioni caratteristiche utilizzate nel caso di questo canale rettangolare. Nello specifico, la valvola capillare ad un livello risulta funzionante solamente nel momento in cui il liquido da bloccare viene accumulato all'interno di un canale dotato di uno spessore 12 volte più elevato rispetto alla sua larghezza [20]. Dunque, essendo questa una soluzione ritenuta difficile da implementare ed integrare all'interno del kit attualmente utilizzato, la sperimentazione della valvola capillare ad un livello è stata abbandonata. Facendo ora riferimento alla valvola capillare a due livelli, è stato possibile evidenziare i seguenti risultati (Figura 11).

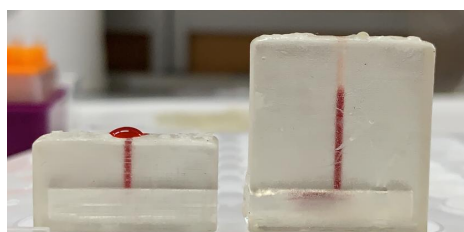


Figura 11: Immagine che evidenzia la differente funzionalità della valvola capillare in funzione del volume di campione da immobilizzare.

La sperimentazione ha mostrato come, per ottenere un corretto funzionamento della valvola capillare, sia necessario per prima cosa minimizzare il volume di campione da bloccare e la sezione del canale all'interno del quale esso viene raccolto. Questi due parametri permettono di minimizzare sia la pressione agente sulla valvola, sia l'aumento delle dimensioni del menisco di sangue che si affaccia sul canale di rilascio, evitando dunque che possa essere raggiunta una condizione che induca la rottura del menisco e la conseguente perdita di tenuta della valvola. Queste due condizioni devono comunque essere accompagnate da una consistente variazione delle dimensioni caratteristiche del canale di raccolta, le quali permettono di evitare fenomeni di adesione superficiale fra il menisco di sangue e le pareti a valle della valvola. Quest'ultima sperimentazione ha mostrato come sia possibile immobilizzare in maniera efficace un campione di sangue di al massimo 10 µL all'interno di un canale con sezione quadrata e dotato di un aumento di dimensione caratteristica di almeno

1000 μm . Questo sistema, opportunamente applicato a canali con geometria circolare, è stato successivamente inserito all'interno delle seguenti configurazioni (Figura 12), identificate rispettivamente con i nomi di Tappo Capillare e Chip capillare.

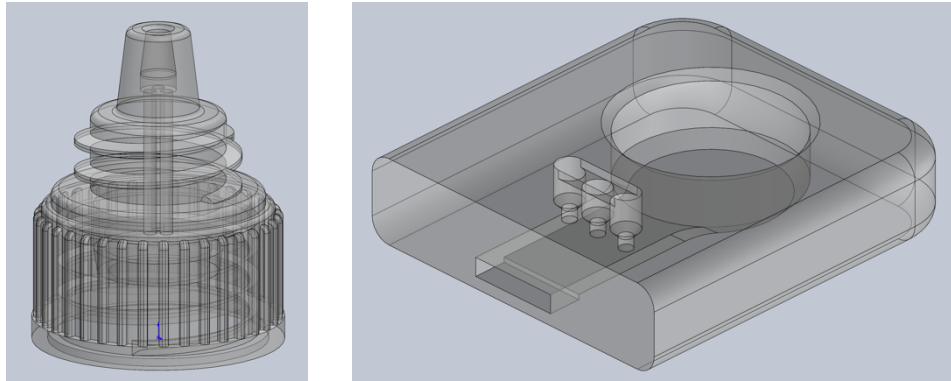
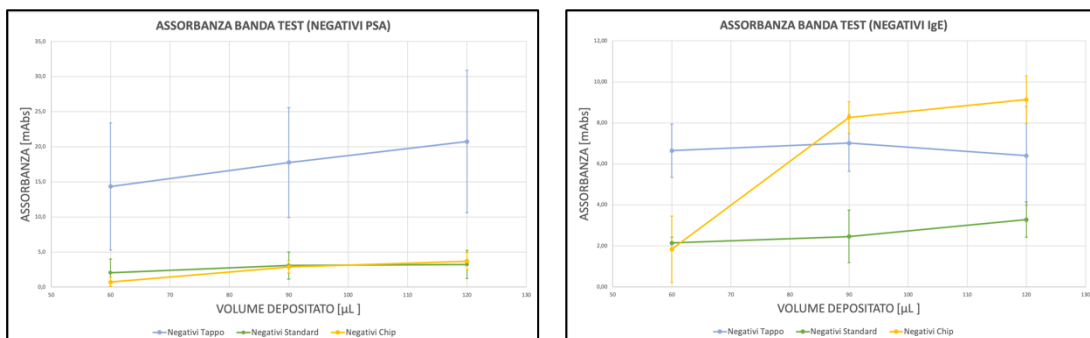


Figura 12: Disegno CAD relativi alle due configurazioni implementate.

La presenza di tre canali all'interno delle precedenti configurazioni è dovuta al fatto che i test su cui saranno sperimentati necessitano di 30 μL di sangue. Il primo dispositivo, accoppiabile con il flacone di diluente, permette di svolgere il test in una condizione di pre-diluizione, mentre il secondo è stato ideato immaginandolo come un'estensione della cassetta in HDPE contenente la membrana reattiva. Come già detto, i dispositivi sono stati infine sperimentati su due differenti test. I campioni positivi sono stati simulati somministrando all'interno di un certo volume di sangue negativo una quantità nota di antigene. I risultati relativi alle assorbanze delle bande test possono essere riassunti attraverso i seguenti grafici (Grafico 1):



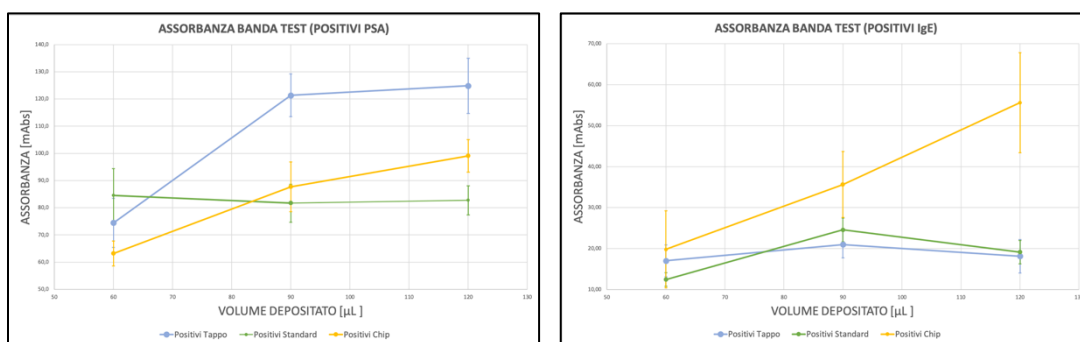


Grafico 1: Grafici che rappresentano il valore di assorbanza assunto dalle bande test in funzione del volume di soluzione depositata sulla membrana reattiva.

I precedenti grafici mostrano una buona compatibilità fra la configurazione standard e le nuove soluzioni implementate, anche se in alcuni casi sono osservabili dei valori che si distaccano dall'andamento generale. Tuttavia, il basso numero di campioni utilizzato fino a questo momento e le modalità con cui sono stati simulati i campioni positivi non permettono di affermare con certezza il reale funzionamento dei dispositivi. Dunque, alcuni risultati ottenuti possono essere giustificati attraverso delle ipotesi che dovranno però essere meglio esplorate in futuro. Nonostante ciò, è possibile affermare come le due soluzioni trovate costituiscano un valido punto di partenza per lo sviluppo di un dispositivo funzionante e rilasciabile sul mercato.

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) [1]. Compilando 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.

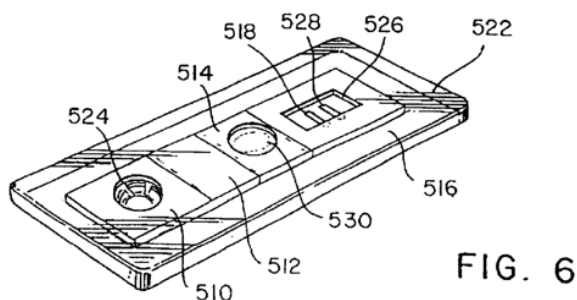


Figura 3: Rappresentazione schematica dell'autotest diagnostico protetto dal brevetto US6541277B1.

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 [2]. 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 [3].

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 [4]. 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).

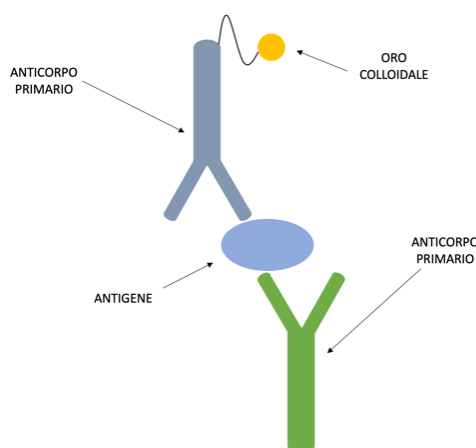


Figura 4: Rappresentazione schematica del riconoscimento diretto ed univoco di un antigene sfruttando due diverse immunoglobuline.

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 [4]. 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 e dimensione. Il ruolo di queste particelle è quello di rendere visibile la posizione e il movimento degli anticorpi a loro legati. 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 [3]:

- 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 gli anticorpi depositati 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 impiegato nella realizzazione di test qualitativi.

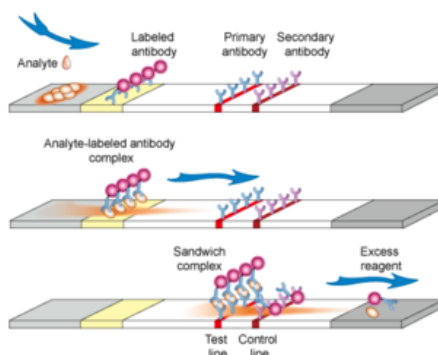


Figura 5: Principio di funzionamento di un LFA con metodo sandwich.

- Metodo competitivo:** viene utilizzato soprattutto per l'analisi di antigeni dotati di dimensioni ridotte, come ad esempio i test impiegati per identificare la presenza di albumina all'interno di un campione. Questo approccio si rende necessario poiché tali 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 di quest'ultima. In altre parole, l'interpretazione del risultato visivo di questo test è l'opposto del metodo competitivo precedentemente descritto;

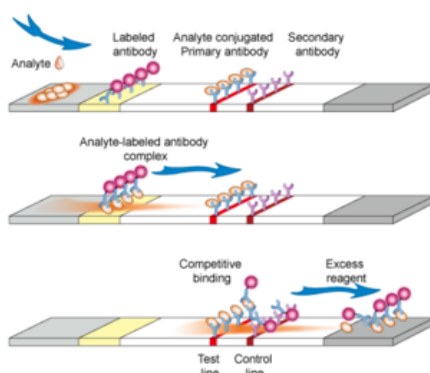


Figura 6: Principio di funzionamento di un LFA con metodo competitivo.

Un ulteriore metodo utilizzato in questo campo, ma che risulta essere di minore interesse in relazione a quanto trattato di 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 quantità 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, 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 nel seguente elenco [5]:

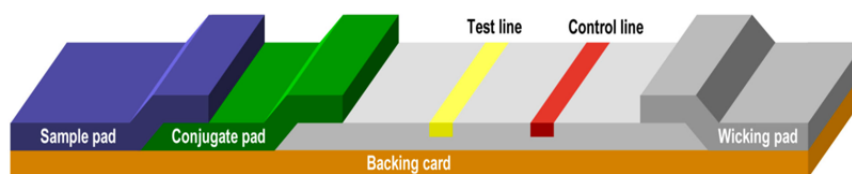


Figura 8: Rappresentazione schematica delle 5 componenti che compongono la striscia reattiva.

-
- **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 di questo componente. Dal punto di vista delle dimensioni, tale membrana è caratterizzata dalla stessa larghezza e lunghezza della striscia globale, accompagnate da 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 [6]. 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 [7]. 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 nitrocellulosa. 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 diluente richiesto e la sua composizione dipendono dalle proprietà e dai

volumi dei detergenti utilizzati, oltre che dalle caratteristiche dell'antigene, il suo ordine di concentrazione nel campione 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 la 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 una delle più diffuse e riconosciute 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 dell'utente. 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, generalmente Polietilene, oppure può anche essere dotata di un ulteriore capillare interno, realizzato in Policarbonato nella maggior parte dei casi. 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 dallo specifico 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. 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, essendo caratterizzata da un costo unitario di circa 7 centesimi di euro. 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 da quelli attualmente utilizzati 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.

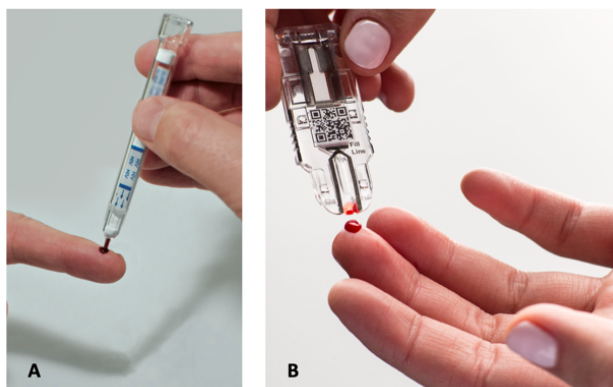


Figura 10: Immagini relative a due autotest presenti in commercio: A) Auto-test per HIV progettato da AAZ e del costo di 54 CHF, B) Auto-test prodotto da Adexus-DX e con un costo di 45.50 CHF.

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, vista la necessità di utilizzare 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. La presenza del bulbo rende l'utilizzo del test contro-intuitivo, dal momento che esso viene spesso utilizzato dagli utenti come meccanismo per creare all'interno dello strumento il vuoto necessario a 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 μL 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 aggiunta, 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) [8].

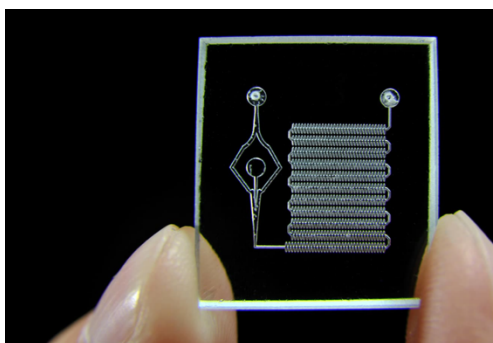


Figura 12: Immagine rappresentativa delle dimensioni di un circuito micro-fluidico.

Tali circuiti, realizzabili a costi molto bassi ed accoppiabili con dispositivi elettronici [9], permettono di manipolare in maniera controllata ed efficiente un volume molto ridotto di fluidi. In alcuni casi, queste operazioni vengono svolte 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 grazie all'interazione superficiale 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 [10]. 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 sfruttando

processi di 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 circuiti come questi sono presenti alcune componenti idrauliche che permettono di bloccare in maniera efficiente un certo volume di fluido, indipendentemente da quelle che sono le proprietà fisiche di quest'ultimo. Il metodo più efficiente per ottenere questo risultato è la realizzazione di valvole costituite da membrane deformabili [11]. 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 $15\ \mu\text{m}$. 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. Infine, verrebbero introdotte molto probabilmente delle ulteriori operazioni che dovrebbe svolgere l'utilizzatore.

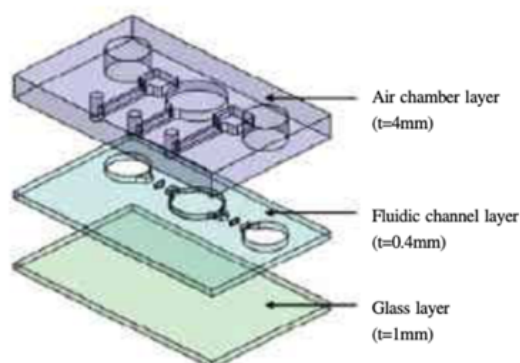


Figura 13: Immagine del circuito realizzato da Wang et al., il quale è caratterizzato dalla presenza di tre strati in materiale differente.

Tuttavia, esistono altri metodi in grado di bloccare un fluido in uno specifico punto ed essi potrebbero rivelarsi efficienti in un'applicazione di questo tipo. In particolare, si può fare riferimento al concetto di valvola capillare [8]. In questo caso infatti, 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 [12]. Un'applicazione di questo genere si rivela interessante per la configurazione richiesta, dal momento che potrebbe essere prelevato uno specifico volume di campione attraverso un fenomeno completamente passivo e che potrebbe 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 fluido dalle caratteristiche note. Esistono in particolare due metodi con cui una valvola capillare può essere realizzata:

- **Cambio di materiale** [13]: in questo caso il blocco del liquido 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 fluido con quest'ultima, garantendone quindi il blocco (Figura 14).

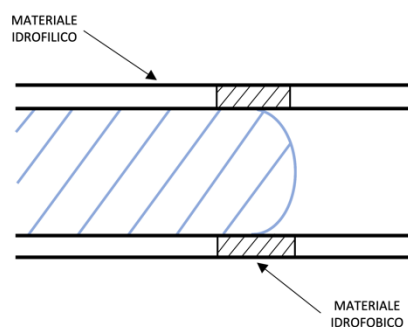


Figura 14: Schema di funzionamento della valvola capillare ottenibile attraverso un cambio di materiale.

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** [14]: 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).

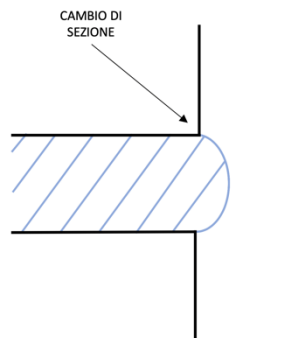


Figura 15: Schema di funzionamento della valvola capillare ottenibile attraverso un cambio di sezione garantito dall'incrocio fra due canali perpendicolari.

In particolare, 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.

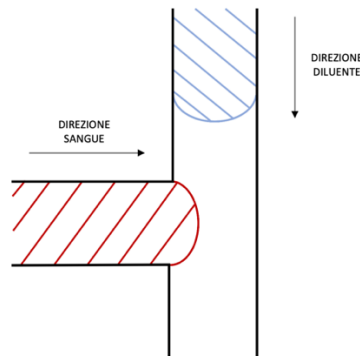


Figura 16: Schema generale del meccanismo di blocco e successivo sblocco della valvola capillare. Questo principio è valido per entrambe le tipologie di valvole basate su un cambio di sezione.

1.4.3 Dimensionamento di una valvola capillare ad un livello

La principale formula utilizzata per dimensionare una valvola capillare ad un livello 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 [15]:

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

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. La struttura di una valvola capillare ad un livello può essere dunque riassunta attraverso il seguente schema geometrico (Figura 17).

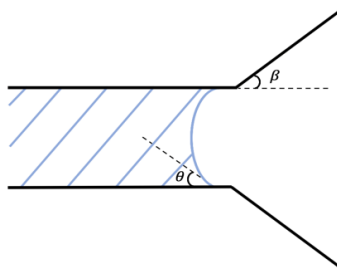


Figura 17: Schema generale della struttura di una valvola capillare ad un livello, dove il cambio di sezione è garantito da una sezione divergente con un minimo angolo pari a β .

Con riferimento alla precedente figura e alla precedente equazione, l'angolo β permetterebbe l'aumento dell'angolo di contatto fra il liquido considerato e la superficie del materiale, in modo tale da indurre la formazione di un'interazione idrofobica fra questi due elementi.

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, simile a quelle descritte nella precedente sezione, 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).

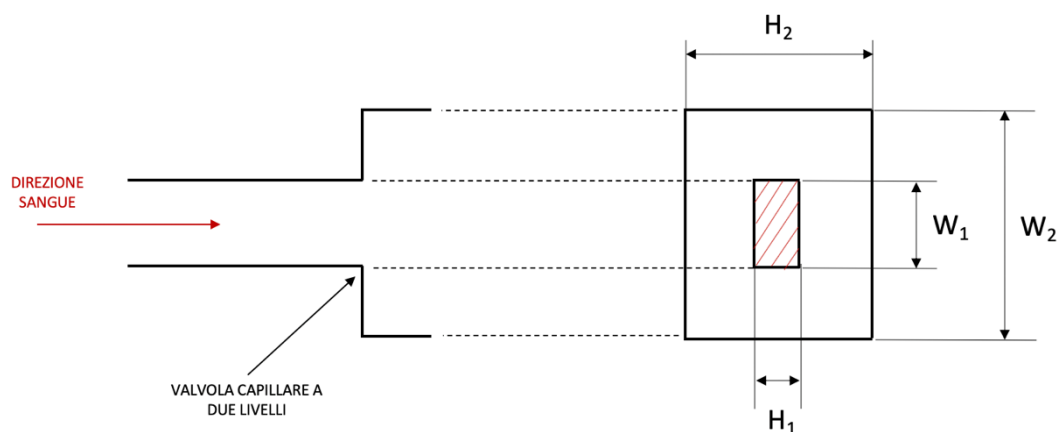


Figura 18: Rappresentazione a due viste della valvola capillare a due livelli, in cui è possibile come l'aumento di sezione sia dovuto sia ad un aumento di spessore che ad un aumento di larghezza.

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, tale valore è definito come il 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 [16] per poter ottenere un efficiente blocco del liquido, condizione che sembra migliorare più ci si avvicina al valore limite appena citato (Grafico 1). Ovviamente, quest'ultima considerazione è valida a parità di caratteristiche delle componenti poste a valle del circuito.

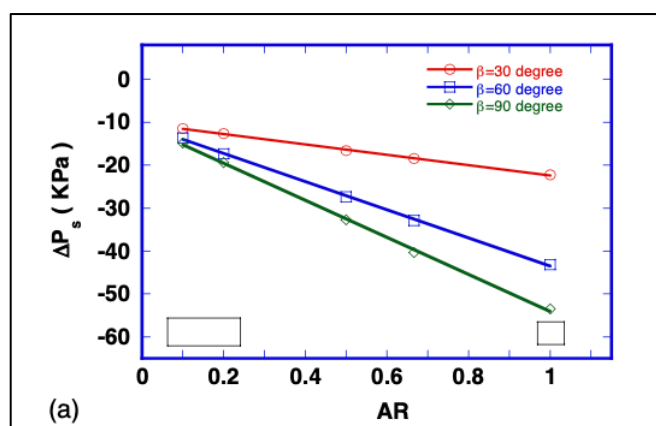


Grafico 1: Grafico realizzato da *Leu et al.* che descrive la caduta di pressione di una valvola capillare in funzione dell'*aspect ratio* e dell'angolo imposto per indurre il cambio di sezione.

Osservando il grafico precedente, è possibile notare come anche in questo caso venga considerato tra i parametri di interesse l'angolo divergente in grado di garantire il 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) [17]:

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

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. Per questo motivo, nella caratterizzazione della valvola capillare a due livelli saranno considerate configurazioni dotate di questa caratteristica. Un ulteriore aspetto da considerare nella progettazione è la differenza di altezza fra il canale a monte e a valle della valvola capillare. In letteratura, questo parametro è genericamente indicato 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 [8]. Di seguito, sono mostrate delle curve di percentuale di successo che descrivono i risultati ottenuti da *Olanrewaju et al.* e che descrivono l'efficacia di quest'ultimo parametro sulla funzionalità della valvola capillare a due livelli (Grafico 2).

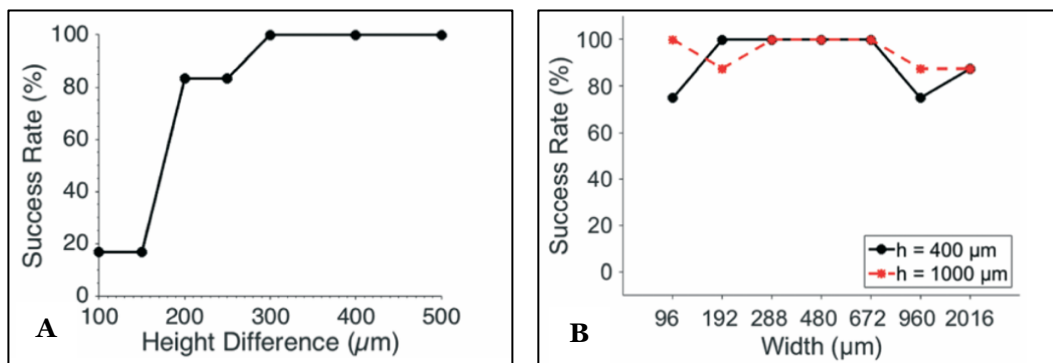


Grafico 2: Grafici che mostrano le curve di successo relative alla tenuta della valvola capillare in funzione A) della differenza di altezza dei canali a cavallo della valvola e B) delle dimensioni del canale rettangolare.

Infine, è opportuno sottolineare che nella letteratura di riferimento utilizzata per la progettazione di questa tipologia di valvola, tutti gli esperimenti sono stati effettuati senza prendere in considerazione i valori assunti da W_1 e W_2 . Dunque, anche durante questa sperimentazione non saranno considerati all'interno dei parametri significativi. Infine, tutti 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 $2 \mu\text{L}$. 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 volume di campione verrà accumulato, dall'altro lato permetterebbe anche di determinare le pressioni agenti su di esso e dipendenti sia dalle dimensioni del condotto che dal suo orientamento nello spazio. Il modello più completo in questo caso è quello di *Lucas-Washburn* [18], il quale si basa sul bilancio di forze che agiscono su un determinato volume di liquido. 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.

Nello specifico, l'equazione mostra come la pressione capillare sia contrastata rispettivamente dalle forze di inerzia, dalla forza di attrito viscoso interna al fluido e agente sulle pareti del condotto e dalla forza indotta dall'eventuale presenza di aria all'interno di un canale chiuso all'atmosfera. Infine, è presente anche un contributo dovuto alla forza di gravità, la quale può contrastare o facilitare il moto del fluido a seconda della modalità con cui tale canale si sta riempiendo. 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. 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 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	CAPILLARITY
IMMUNO-DIAGNOSTIC	MICROFLUIDIC
CAPILLARY STOP VALVE	RAPID TEST
VOLUME CONTROL	PASSIVE FLOW
BODILY FLUID	INTERIOR CHANNEL

Tabella 1: Parole chiave utilizzate per la ricerca brevettuale sui *database* di ricerca.

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 riferimento allo specifico 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. Lo schema seguente mostra il criterio di suddivisione dei brevetti analizzati, il quale ha portato all'identificazione di due configurazioni simili a quella ipotizzata (Tabella 2).

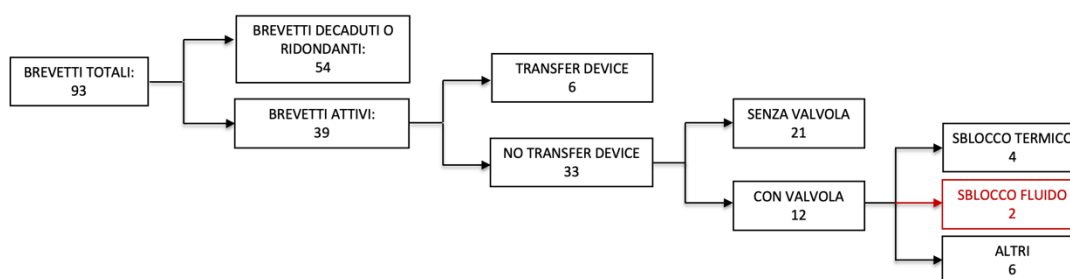


Tabella 2: Schema riassuntivo del processo con cui sono stati suddivisi i brevetti individuati in letteratura.

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 tralasciati i brevetti che presentavano l'utilizzo di *transfer devices*, ovvero dispositivi simili alla micro-pipetta capillare, i quali 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 a questo componente all'interno del loro testo. 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. Nel caso del brevetto US8105849 invece, il principio di funzionamento utilizzato è analogo a quanto descritto fino a questo punto, dal momento che la valvola capillare utilizzata per bloccare un fluido viene successivamente sbloccata dalla sua interazione con un secondo liquido (Figura 19).

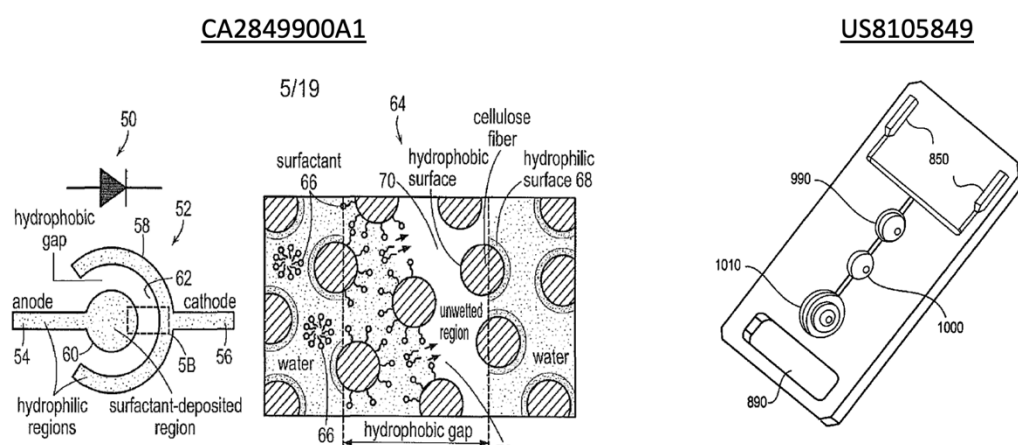


Figura 19: Immagine che rappresenta i due principali brevetti isolati durante la ricerca brevettuale.

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, per il controllo della soluzione diluente si è deciso di prendere in considerazione due configurazioni trovate nella ricerca appena descritta e legate a due brevetti decaduti (Figura 16). Considerando il brevetto US6261519B1, questa configurazione presenta l'utilizzo di una seconda valvola capillare per bloccare due o più liquidi miscelati fra loro. Essa è posizionata alla fine di un canale, il quale deve essere opportunamente dimensionato in modo tale che possa contenere un volume predefinito della miscela appena citata. Il tutto è accoppiato ad un *réservoir* di drenaggio, posto all'inizio del canale descritto in precedenza, il quale permetta 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. Questa soluzione inoltre renderebbe completamente trascurabili le oscillazioni di volume dovute ad eventuale evaporazione.

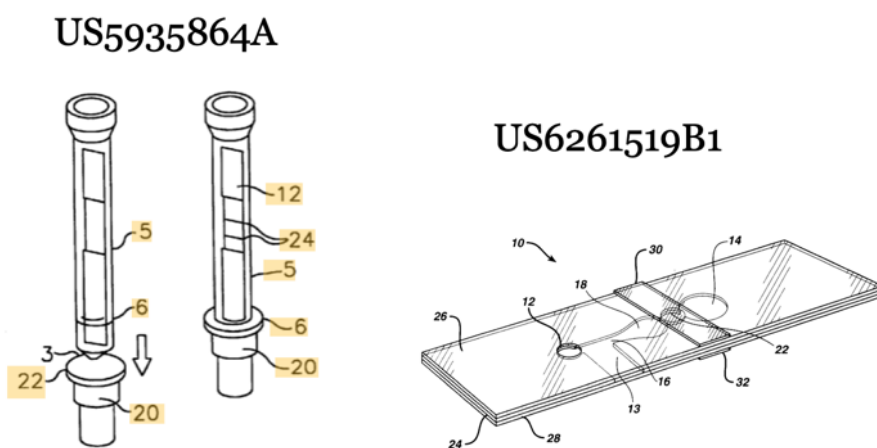


Figura 20: Viste dei due brevetti decaduti ed ipotizzati idonei per il controllo del volume di diluente.

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 iniziale molto costoso, 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 sfruttare 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).

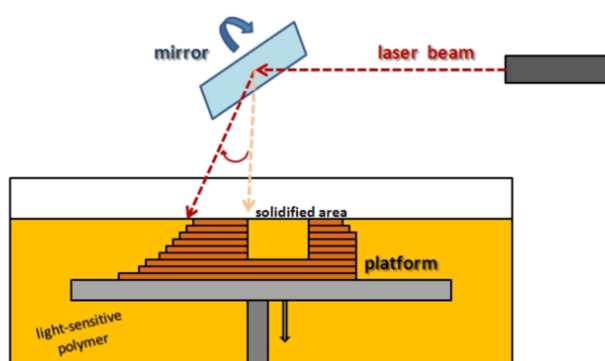


Figura 21: Schema rappresentativo del processo di Stereolitografia.

L'utilizzo di questa 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 tipicamente utilizzati in questo ambito per la realizzazione di prodotti finiti. Possono essere infatti impiegate solamente resine appositamente sviluppate per questo processo di prototipazione e che saranno descritte 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 realizzata da FormLabs.

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. Nello specifico, è stata utilizzata una soluzione di 2-propanolo $\geq 70\%$ (v/v) rilasciata da *VWR Chemicals*. 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 di seguito (Figura 23), dotato di 4 lampade UV da 9W ciascuna. In particolare, ciascun prototipo realizzato è stato sottoposto ad un processo di polimerizzazione per circa 30 minuti.



Figura 23: Immagine relativa al fornello 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 μm 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 un fenomeno di diffrazione della luce che porta 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 μm . 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 dotati di geometrie e forme anomale. Per concludere, nel caso di elementi accoppiati, si rende necessario disegnare albero e foro con una differenza di dimensione nominale pari ad almeno 200 μm per simulare in maniera corretta il loro incastro. Questo accorgimento si rende necessario per via dell'incertezza di lavorazione legata ad un processo di questo tipo. Tutti questi vincoli sono

stati tenuti in considerazione nella fase di progettazione in modo tale da poter ottenere dei prototipi effettivamente utilizzabili.

2.1.2 Validazione processo di prototipazione

Per valutare l'efficienza della prototipazione e la sua idoneità alla sperimentazione in atto, sono state compiute delle analisi delle proprietà superficiali dei pezzi stampati. In particolare, sono state effettuate delle analisi di rugosità relative alla superficie dei prototipi. Questa analisi permette di determinare differenti parametri utili alla sperimentazione. Nello specifico, i dati ricavati sono stati impiegati 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 di tale morfologia superficiale da quella ottenibile per stampaggio ad iniezione. Per quest'ultimo motivo, l'analisi di rugosità è stata svolta anche sulla superficie delle cassette in HDPE utilizzate dall'azienda. L'analisi superficiale si è basata sul l'utilizzo di un microscopio laser confocale a luce riflessa (Figura 24).



Figura 24: Immagine del microscopio *LEXT-OLS4100*, *Olympus* utilizzato per le analisi di rugosità superficiale.

Per quanto riguarda lo studio di bagnabilità della superficie del materiale utilizzato nella sperimentazione, è stato determinato il valore medio dell'angolo di contatto di alcune soluzioni di interesse. In particolare, è stato determinato il valore medio di angolo di contatto assunto dal sangue e dalle soluzioni diluente utilizzate. Le immagini relative agli angoli di contatto sono state ottenute 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 da seguire in questa fase prevede la deposizione di gocce di sangue o diluente con un volume pari a 10 μL 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 sulle lastre stampate in SLA. L'immagine mostra gli angoli di contatto individuati e l'ottenimento del loro valore numerico attraverso software *Matlab*.

Dunque, indipendentemente dal fluido utilizzato, sono stati ricavati 24 valori di angolo di contatto, i quali sono stati successivamente importati su *Excel* in modo tale da valutare il valore medio e la deviazione standard di ognuno di essi. 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 tracciare manualmente delle rette sull'immagine. La pendenza di queste rette viene ricavata poi automaticamente dal codice, indicata a video e salvata in un opportuno vettore dedicato per ogni immagine.

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).

$$\begin{array}{l} \text{GEOMETRIA} \\ \text{CILINDRICA} \end{array} \quad 4\gamma \cos(\theta)\pi R - 8\pi\mu h \frac{dh}{dt} \pm \pi R^2 \rho g \sin(\alpha) h = 0$$
$$\begin{array}{l} \text{GEOMETRIA} \\ \text{RETTANGOLARE} \end{array} \quad 4\gamma \cos(\theta) (w + s) - \frac{24(w + s)\mu}{h} h \frac{dh}{dt} \pm \rho w s g \sin(\alpha) h = 0$$

Equazione 5: Equazioni differenziali relative al bilancio di forze agenti sul volume di fluido nel caso di geometria cilindrica e rettangolare. In ordine, sono riportati in entrambi i casi i contributi della forza capillare, della forza di attrito viscoso e della forza peso.

Nelle due equazioni appena riportate, i parametri fisici e geometrici 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].

In entrambe le equazioni, l'espressione della forza peso è accompagnata dalla presenza del segno \pm poiché, come già spiegato nel primo capitolo, il suo contributo dipende dall'orientamento del canale all'interno dello spazio. Per questo motivo, ognuna delle equazioni precedenti è stata risolta nelle sue due differenti versioni.

La loro risoluzione 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 stesso e le proprietà geometriche del canale in cui esso scorre. In particolare, le equazioni precedenti fanno riferimento alle seguenti configurazioni geometriche (Figura 27).

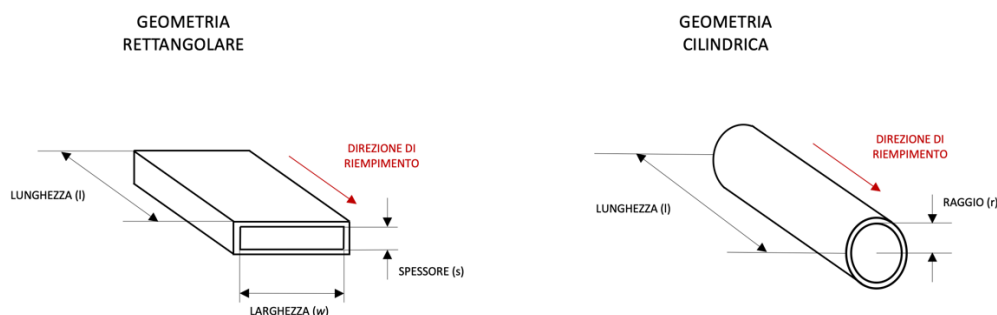


Figura 27: Schemi geometrici delle configurazioni considerate nei modelli analitici di riempimento dei canali.

Le equazioni ottenute sono state poi rimaneggiate in modo tale da ottenere funzioni che permettano di individuare il tempo di riempimento di un canale capillare nelle suddette condizioni. 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. I quattro 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, è stato utilizzato sangue umano, trattato con EDTA, sia per le prove preliminari necessarie a valutare la tenuta della valvola, sia per le prove di funzionalità dei dispositivi. All'interno degli esperimenti sono state utilizzate soluzioni diluenti specifiche per la tipologia di test in esame ed infine, è stata valutata la compatibilità delle configurazioni progettate 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, come ad esempio la viscosità e la presenza di cross-interferenti. Tuttavia, essendo stata utilizzata una sostanza chelante sui campioni di interesse, non sono stati considerati gli effetti della coagulazione sulla funzionalità.

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 l'effetto dei 3 parametri fondamentali descritti nel precedente capitolo, ovvero:

- Volume del campione (10 μL , 20 μL , 30 μL);
- *Aspect ratio* (1, 0.5, 0.34);
- ΔH (500 μm , 1000 μm , 1500 μm , 2000 μm).

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 appena riportati. Essi sono stati valutati secondo uno schema che può essere riassunto in maniera efficiente dalla seguente tabella (Tabella 3):

$\Delta H = 1000 \mu\text{m}$			
ASPECT RATIO	VOLUME DI SANGUE [μL]		
	10	20	30
1			
0,5			
0,34			

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

Per ogni tripletta di parametri, sono state effettuate delle prove su tre prototipi differenti 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 trattenere, esso viene mantenuto all'esterno del dispositivo per almeno 1 minuto. Questa prova ha come obiettivo quello di dimostrare la capacità della valvola di accumulare solamente il volume di sangue per cui è stata dimensionata. Nel caso della valvola capillare ad un livello invece, essendo solamente uno il parametro di interesse, si è deciso di effettuare una sperimentazione su 5 campioni per ogni configurazione individuata. La funzionalità di questi ultimi campioni è stata valutata con 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 alla concentrazione PSA (*Prostate-specific antigen*) e alla concentrazione di IgE totali. Si è deciso di valutare il funzionamento di questi due test dal momento che in entrambi i casi, utilizzando delle opportune soluzioni standard, è possibile andare a inserire all'interno del sangue l'antigene oggetto dell'analisi in modo da ottenere dei campioni positivi con concentrazione nota. Le soluzioni contenenti gli antigeni appena descritti sono rilasciati dalla società di standardizzazione internazionale NIBSC, con codici di riferimento 96/670 per il PSA e 11/234 per le IgE totali. Il primo test viene utilizzato per identificare pazienti caratterizzati da ipertrofia della prostata, fattore fortemente correlato al 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 è stata valutata attraverso un protocollo che tiene conto di quelli che sono considerati gli aspetti più critici per 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 lettore immuno-cromatografico (Figura 28), ovvero uno strumento in grado di andare a misurare l'intensità di colorazione della banda test e della banda di controllo in termini di assorbanza. In questo modo, sarà possibile valutare sia il funzionamento globale di ciascuna configurazione, sia la visibilità delle bande;



Figura 28: Immagine relativa al lettore immuno-cromatografico *Hamamatsu Photonics*, modello *C10066-10*.

- **Emolisi:** è un parametro valutato visivamente sulla componente in nitro-cellulosa. Nello specifico, può essere individuata valutando se tale componente della striscia reattiva è caratterizzata da una colorazione rosata nel caso di bassa emolisi, 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 sia sul corretto flusso della soluzione all'interno della striscia reattiva, sia sul corretto funzionamento del test;
- **Dissociazione del marcato:** viene valutata visivamente la sovrapposizione del fronte di moto del campione diluito e del marcato. Nel caso in cui tale sovrapposizione non sia presente, potrebbe verificarsi la non corretta marcatura dell'antigene;
- **Confronto finale:** i risultati di ciascuna configurazione saranno confrontati con gli stessi dati ricavati nel caso del test standard, in modo da identificare lo stato di funzionamento dei nuovi dispositivi rispetto alle condizioni 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, sui quali l'unico componente mancante è il *pad* assorbente. I due test analizzati in questo caso sono caratterizzati dalla stessa configurazione per quanto riguarda la struttura della membrana reattiva. Nello specifico, sono stati utilizzati dei laminati *MDI – Membrane Technologies (CNP – L2 – H50)*, caratterizzati da una membrana in nitrocellulosa con lunghezza pari a 25mm. Essendo entrambi test su sangue, il *pad* assorbente utilizzato in questo caso è un *blood separator (MDI, FR2)*.



Figura 29: Immagine rappresentativa di un laminato rispettivamente con e senza *pad* assorbente. L'immagine riporta i laminati utilizzati e venduti dall'azienda *MDI-Membrane Technologies*.

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. Il trattamento preliminare del laminato prevede la semina di anticorpi in corrispondenza della membrana in nitrocellulosa per realizzare le due bande. Parallelamente, avviene la deposizione della soluzione di nano-particelle d'oro coniugate in corrispondenza del *conjugate pad*. Per realizzare tale operazione viene utilizzato una macchina da semina realizzata *ad hoc* per questa tipologia di lavorazione. Nello specifico, in questa sperimentazione è stato utilizzato un macchinario della *Imagene Technology*, modello *IsoFlow Flatbed Dispenser* (Figura 30).



Figura 30: 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 polimerici e un ugello metallico. In particolare, i primi

due aghi vengono utilizzati per la deposizione degli anticorpi sulle due bande (Figura 31), mentre l'ugello viene utilizzato per dispensare la soluzione marcante sul *conjugate pad*.

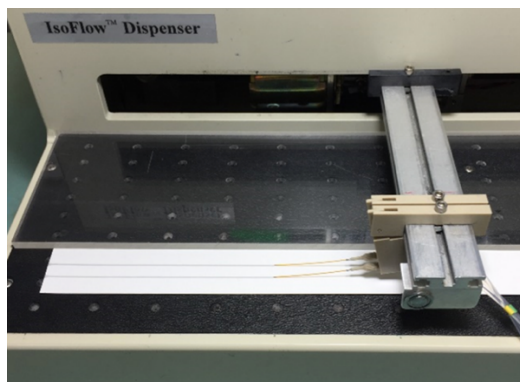


Figura 31: Immagine rappresentativa del funzionamento della *IsoFlow Dispenser*.

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 a basse concentrazioni. Tale zucchero, possedendo una struttura ramificata, ha una funzione di distanziatore fra gli anticorpi sospesi in modo tale che, una volta depositati sulla membrana reattiva, risultino uniformemente distribuiti all'interno delle due bande. Considerando quelle che sono le concentrazioni degli anticorpi, per una questione di riservatezza, 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 una concentrazione 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 un processo durante il quale la loro superficie viene ricoperta con gli anticorpi necessari. Il risultato finale di questa preparazione può essere riassunto attraverso la seguente immagine (Figura 32):

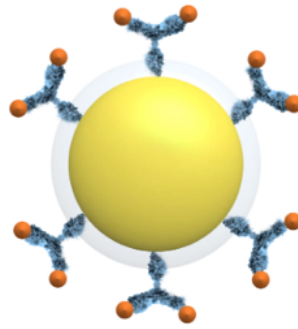


Figura 32: Rappresentazione di una nano-particella d'oro ricoperta di anticorpi.

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 della superficie sprovviste di copertura, 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 presentano al loro interno immunoglobuline differenti. Nello specifico, gli anticorpi utilizzati sono:

- **Goat anti-Mouse IgG:** anticorpo secondario utilizzato per la realizzazione di entrambe le bande di controllo, dal momento che la sua funzione è quella di immobilizzare sulla nitrocellulosa le particelle d'oro andando a legarsi con gli anticorpi coniugati ad esse;
- **Mouse anti-Human IgE:** anticorpo secondario 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 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 gli anticorpi sui laminati a disposizione. Una volta portata a termine la semina, i laminati sono stati 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.

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, 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.

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).

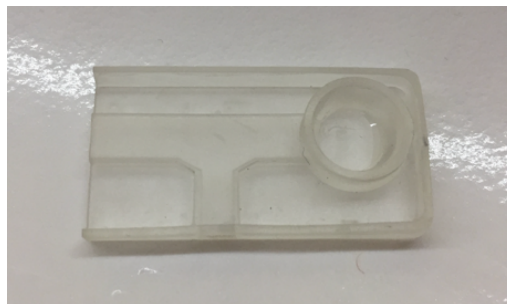


Figura 33: Vista del dispositivo su cui sono state effettuate le prove di rugosità per determinare l'idoneità del processo di prototipazione.

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 mm² con un ingrandimento 20x dello strumento di microscopia utilizzato. 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, si è ipotizzato che 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.

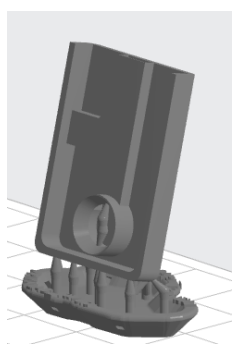


Figura 34: Immagine che rappresenta la disposizione del prototipo all'interno del piano di stampa.

Tuttavia, analizzando più nel dettaglio le immagini attraverso il software dedicato, 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).

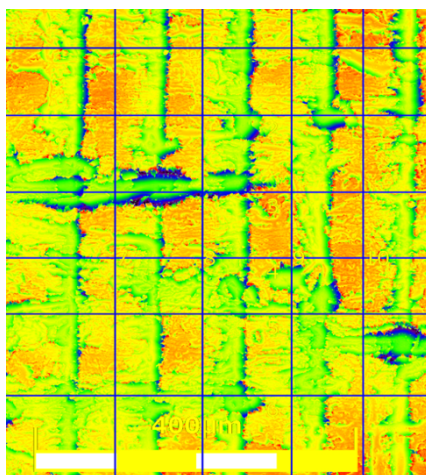


Figura 35: Immagine scattata attraverso un microscopio ottico e che mostra il forte orientamento della rugosità superficiale.

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 polimerizzazione in serie dei piani di materiale, i quali 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 software le 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 4):

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 4: 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).

Per prima cosa, è possibile notare come il processo di stampa 3D restituisca dei valori di rugosità circa sei volte più elevati rispetto allo stampaggio ad iniezione. In particolare, il dato che risulta essere più impattante è sicuramente il valore medio assunto da R_T . Per questo motivo, tale parametro è stato indagato successiva fase di 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):

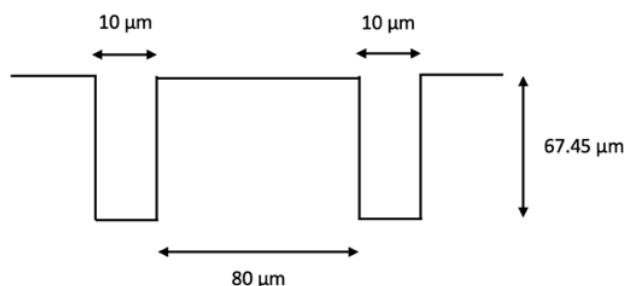


Figura 36: Rappresentazione schematica della morfologia superficiale sulla base dei dati di rugosità ottenuti al microscopio ottico.

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 [18] 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 determinati 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 durante l'analisi (Tabella 5).

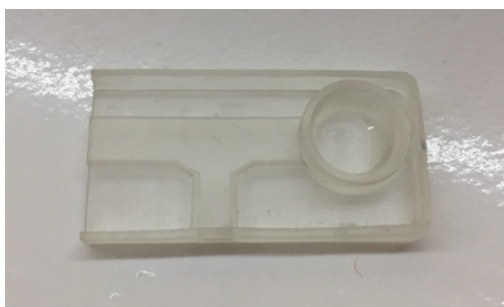
ANALISI ANGOLO DI CONTATTO				
Soluzione	Sangue	PBS	Fisiologica	Tris-glicina
Media [°]	55.9	47.8	60.2	54.6
Dev. Std. [°]	5.17	7.1	9.1	6.7

Tabella 5: 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 considerate abbiano un angolo di contatto ben lontano da tale valore. Infine, è opportuno focalizzare l'attenzione sul valore di angolo di contatto assunto dal sangue con la superficie del materiale impiegato. Esso è di fondamentale importanza dal momento che 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 parametro sia molto simile a quelli individuati in letteratura nel caso del polietilene, del policarbonato e del PMMA [20].

3.2 Prove di tenuta della valvola ad un livello

Per prima cosa, è stata data precedenza alla sperimentazione della 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 caratteristiche del canale di raccolta del sangue, esse sono state selezionate attraverso la valutazione delle pressioni capillari agenti sul fluido e attraverso l'utilizzo del modello analitico di Lucas-Washburn. In questo caso, il tempo riempimento del canale è stato ricavato ipotizzando che il riempimento dal basso, dal momento che questa è la condizione peggiore in cui il sistema potrebbe trovarsi (Grafico 3).

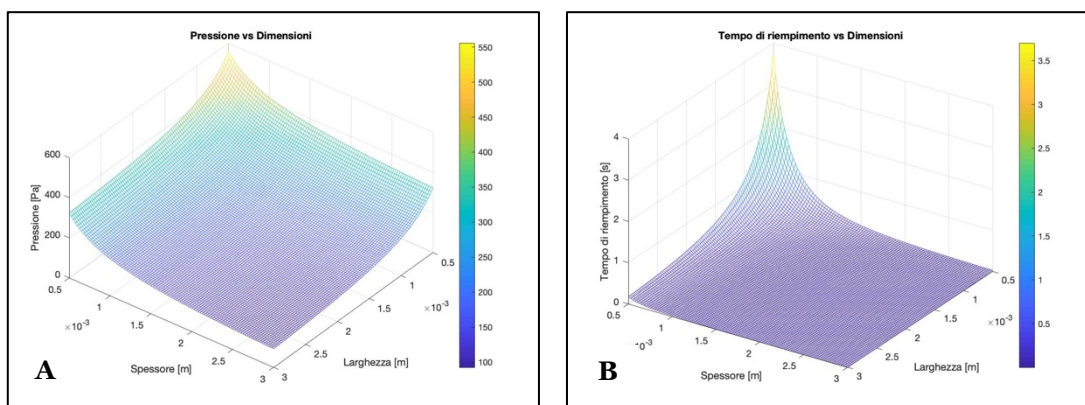


Grafico 3: Grafici bi-dimensionali in cui sono riportati i valori di A) pressione capillare e B) tempo di riempimento di un canale con sezione rettangolare.

I grafici precedenti sono stati ricavati 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 caratteristiche della sezione. 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 60° , valore che è stato selezionato in funzione dei dati ottenuti dall'analisi di angolo di contatto e tenendo conto dell'Equazione 2 di dimensionamento. 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 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 37) e sono validi per tutti i 5 campioni sperimentati in questa fase:

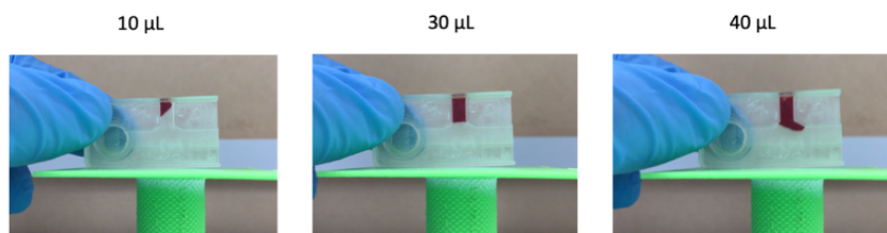


Figura 37: Sequenza rappresentante il comportamento della valvola capillare nella fase di riempimento.

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 data analizzando più nel dettaglio la letteratura scientifica disponibile. Infatti, facendo particolare riferimento al lavoro svolto da Melin et al. [20], è possibile osservare come una valvola capillare ad un livello sia efficace 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 38). In altre parole, è necessario utilizzare un canale rettangolare caratterizzato da uno spessore molto più elevato rispetto alla larghezza, requisito che nel prototipo appena sperimentato non è stato rispettato.

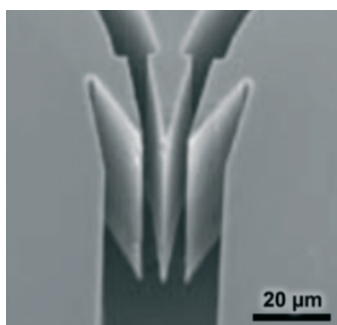


Figura 38: Immagine di microscopia relativa ad una valvola capillare ad un livello. Come è possibile notare, l'aumento di sezione garantisce il blocco di un fluido solamente nel caso di un canale dotato di uno spessore molto più elevato rispetto alla larghezza.

Queste ultime considerazioni non solo permettono di comprendere l'inefficacia della valvola nel trattenere il sangue, ma portano anche ad un cambio di impostazione della progettazione del dispositivo. Infatti, per poter rispettare allo stesso tempo il requisito appena descritto 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 39). Essi presentano una geometria semplice ma che permette di andare a considerare tutti i parametri di interesse descritti nel precedente capitolo.

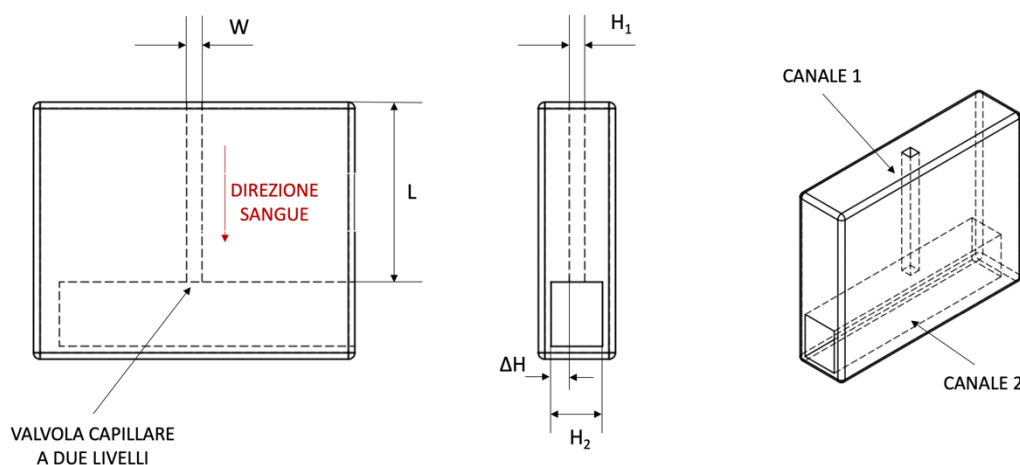


Figura 39: Schema dei dispositivi utilizzati per la sperimentazione dei parametri che influenzano il funzionamento della valvola capillare a due livelli.

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 e il secondo 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 questo motivo, 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 per analizzare la tenuta della valvola nella condizione peggiore in cui il sistema si possa trovare, dal momento che in questo caso sul componente idraulico insisterebbe anche la pressione generata da una colonna di

fluido. 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 nonostante la successiva aggiunta di liquido in eccesso. Tali grafici sono riportati qui di seguito (Grafico 4):

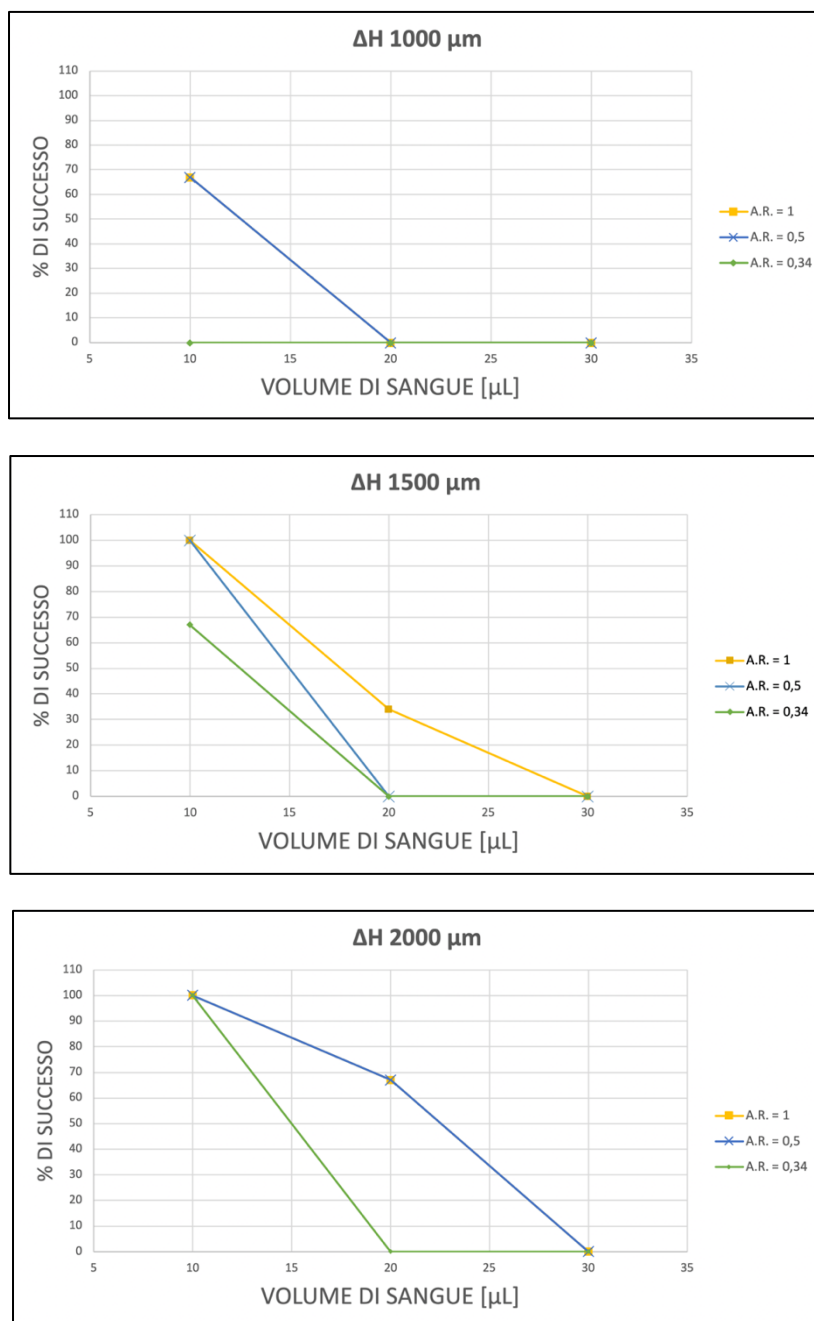


Grafico 4: Grafici che mostrano l'andamento delle curve di successo in funzione dei parametri considerati nella fase di progettazione. In particolare, sono riportate le curve di successo nei tre principali casi di ΔH, ovvero A) 1000 μm B) 1500 μm c) 2000 μm.

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 40). Fatta questa considerazione, osservando i dati riportati 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.

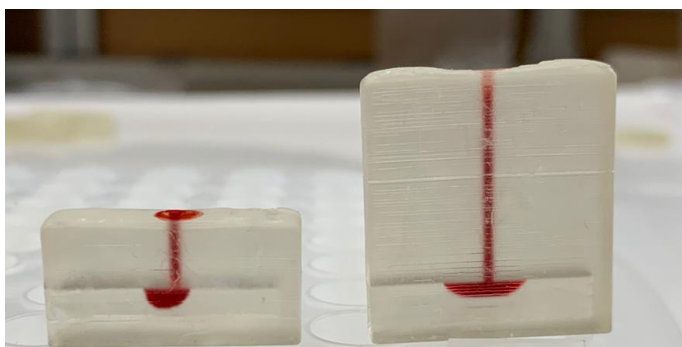


Figura 40: Immagini che testimoniano l'inefficienza della valvola capillare a due livelli nel caso di un ΔH pari a $500 \mu\text{m}$.

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 sia caratterizzata da un miglioramento in termini di funzionalità. Dopodiché, i dati suggeriscono come anche un aumento del valore di *aspect ratio* sia in grado di garantire una maggior efficienza nel funzionamento della valvola. In particolare, i dati mostrano come le configurazioni caratterizzate da *aspect ratio* pari a 1 e 0.5 presentino un andamento simile dal punto di vista della percentuale di successo, seppur con la differenza che la prima condizione sembrerebbe essere quella più funzionale fra le due. Infine, l'ultimo aspetto che occorre considerare in questa fase sperimentale è l'andamento delle curve di successo in funzione del volume di sangue depositato all'interno delle configurazioni. 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 $30 \mu\text{L}$. 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 $30 \mu\text{L}$ di sangue. Per questo motivo, è stato indagato ulteriormente questo aspetto, ovvero si è cercato di far variare ulteriori parametri di progetto per capire se ci fosse la possibilità di ottenere una configurazione in grado di bloccare $30 \mu\text{L}$ di sangue. Nello specifico, sono state sperimentate delle configurazioni in grado di contenere un volume di sangue pari a $30 \mu\text{L}$ e tutte dotate di *aspect ratio* 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. Per comprendere in maniera più approfondita il ruolo di ogni singolo parametro sperimentato finora, si è deciso di considerare l'equilibrio di forze agenti in corrispondenza del menisco di fluido che si affaccia sulla valvola capillare. Come già mostrato attraverso l'Equazione 3, riportata nuovamente qui di seguito, la presenza di un cambio di sezione caratterizzato da un angolo di 90° permette di annullare la pressione capillare agente sul fluido.

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

Dunque, essendo tutte le configurazioni sperimentate caratterizzate da questa specifica, l'unica forza in grado di andare a inficiare il funzionamento della valvola è quella relativa alla colonna di fluido che si forma all'interno del canale di raccolta. Questo risultato è concorde con parte dei risultati ottenuti, dal momento che a parità di sezione resistente e di valore di ΔH , un aumento di volume di campione corrisponde ad un aumento della colonna di fluido agente sulla valvola capillare. Dunque, questo aspetto permette di spiegare per quale motivo un aumento del volume di campione sia seguito da una diminuzione dell'efficienza di tenuta della valvola (Figura 41).

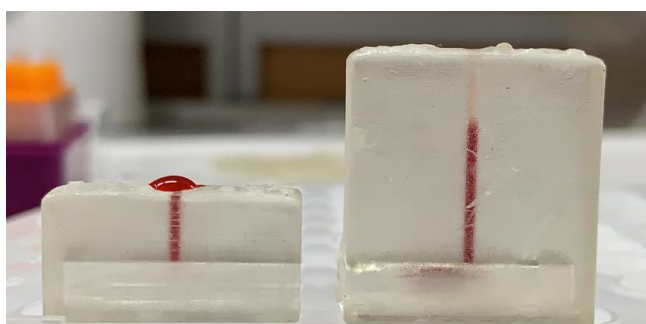


Figura 41: Immagini relative all'effetto del volume del campione sulla tenuta della valvola capillare a due livelli. In questo caso, sono rappresentate de valvola contenenti rispettivamente 10 μL e 30 μL .

Per spiegare invece l'impatto dell'*aspect ratio* sul funzionamento della valvola capillare, è necessario considerare dei fenomeni locali che avvengono in corrispondenza del cambio di sezione utilizzato per bloccare il fluido di interesse. Nello specifico, è stata considerata la curvatura assunta dal menisco di sangue in corrispondenza della valvola. La formazione di un menisco sporgente rispetto al canale di raccolta porta all'aumento del volume accumulabile all'interno di esso, avendo quindi come diretta conseguenza l'incremento di pressione agente sulla sezione. La condizione appena descritta può essere spiegata attraverso un modello presente in letteratura [21], il quale fornisce una formula analitica per stimare l'aumento del volume di fluido associato alla curvatura del fronte di un generico liquido:

$$dV = \frac{wh^2}{4\sin(\alpha)} \left[\frac{\alpha}{\sin(\alpha)} - \cos(\alpha) \right]$$

Equazione 7: Formulazione che descrive l'incremento di volume generato dalla comparsa di un menisco in corrispondenza di una valvola capillare.

Per prima cosa, è opportuno sottolineare come l'incremento di volume sia proporzionale al prodotto fra le dimensioni caratteristiche del condotto in cui si sta accumulando il sangue. Di conseguenza, il valore di dV è proporzionale all'area occupata dalla sezione resistente del canale. Il valore di *aspect ratio* analizzato nella precedente sperimentazione è un indice indiretto di tale area e ciò spiegherebbe perché la miglior funzionalità della valvola capillare è stata ottenuta nel caso di valori di A.R. pari a 1. In quest'ultimo caso infatti sono considerati dei canali con sezione quadrata, aspetto che permette di minimizzare l'incremento di volume descritto nella precedente formulazione. Infine, è da sottolineare come il valore di α dipenda non solo dalle proprietà di bagnabilità della superficie, ma anche dalla pressione agente sulla sezione. Come già anticipato, l'unica pressione agente su questa configurazione in condizioni statiche è la pressione dovuta alla colonna di fluido che si viene a formare a monte della valvola. Dunque, a parità di sezione, un aumento del volume di sangue induce un aumento della curvatura del menisco che, come già mostrato, può portare ad un cedimento della valvola generato quindi dalla rottura del menisco [17].

Per concludere, è stato indagato il contributo del valore di ΔH rispetto al funzionamento della valvola capillare. Esso può essere considerato sia come la distanza a cui si trovano le pareti del canale di rilascio rispetto alla posizione della valvola capillare, sia come un indice indiretto dell'aumento della sezione resistente cui va incontro il sangue durante il suo moto. I dati mostrano come l'incremento di questo valore migliori l'efficienza di funzionamento del dispositivo analizzato. Sulla base di quanto detto finora, in corrispondenza della valvola capillare sono presenti delle forze agenti sul menisco di sangue che, seppur molto limitate, potrebbero indurre il tardivo ripristino del moto del campione. Tale aspetto è infatti stato

osservato su alcune delle configurazioni sperimentate. Il ruolo di ΔH che è stato ipotizzato in questo caso è semplicemente quello di garantire un opportuno distanziamento della valvola capillare dalle pareti del condotto di rilascio, in modo tale che, nonostante la crescita del menisco, il fronte di fluido non possa entrare in contatto con la superficie posizionata a valle della valvola capillare. In caso contrario infatti, i fenomeni di adesione fra sangue e pareti permetterebbe nuovamente il movimento del campione ancora prima che si verifichi l'eventuale rottura del menisco di fluido.

Tenendo conto delle considerazioni fatte fino a questo punto, si è deciso di abbandonare l'individuazione di una configurazione che permetta di accumulare 30 μL di sangue all'interno di un unico canale con sezione costante, data la complessità sperimentale e progettuale riscontrata per un dispositivo con tali caratteristiche. Questa scelta progettuale ha un ulteriore effetto sulla realizzazione del dispositivo, ovvero quella di rendere necessario l'abbandono del meccanismo di controllo del volume di diluente basato sul 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. Risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso di un volume pari a 20 μL , ma con un'efficienza inferiore.

Sulla base delle considerazioni fatte fino a questo punto, si è deciso di realizzare i dispositivi contenenti una valvola capillare a due livelli caratterizzata dalle seguenti caratteristiche:

- *Aspect ratio* = 1, in modo tale da minimizzare la superficie occupata dal menisco di sangue in corrispondenza della valvola capillare;
- $\Delta H \geq 2000 \mu\text{m}$ per garantire il distanziamento dalle pareti a valle della valvola capillare;
- Suddivisione del volume di campione necessario in differenti canali, ognuno dei quali contenente al massimo 10 μL .

I requisiti di progetto elencati hanno portato alla progettazione dei due componenti riportati qui di seguito, i quali verranno indicati da questo momento in avanti con i nomi di Tappo Capillare e Chip Capillare (Figura 42).

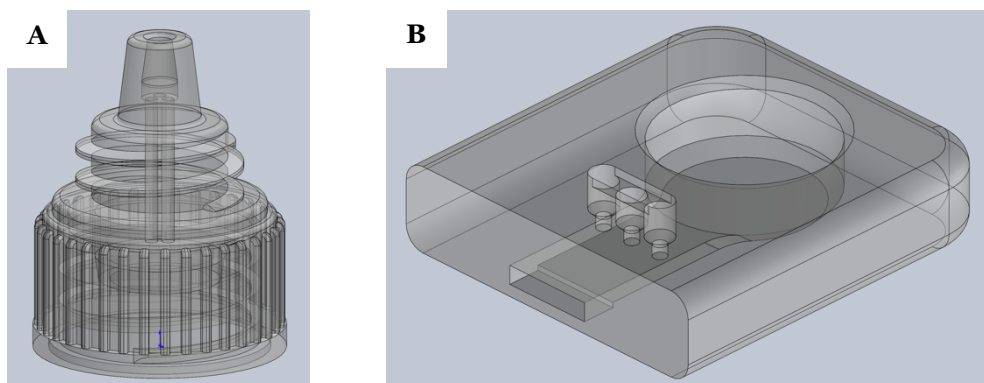


Figura 42: Immagini rappresentative di A) Tappo capillare e B) Chip Capillare, dalle quali è possibile notare la presenza di più canali per riuscire ad accumulare e bloccare un volume di sangue pari a 30 μL .

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 unico ingresso per i tre canali di raccolta del sangue, scelta che si è resa necessaria per evitare un incremento di operazioni che l'utilizzatore 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 l'incremento di volume dovuto alla formazione del menisco alla fine di ogni canale.

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).

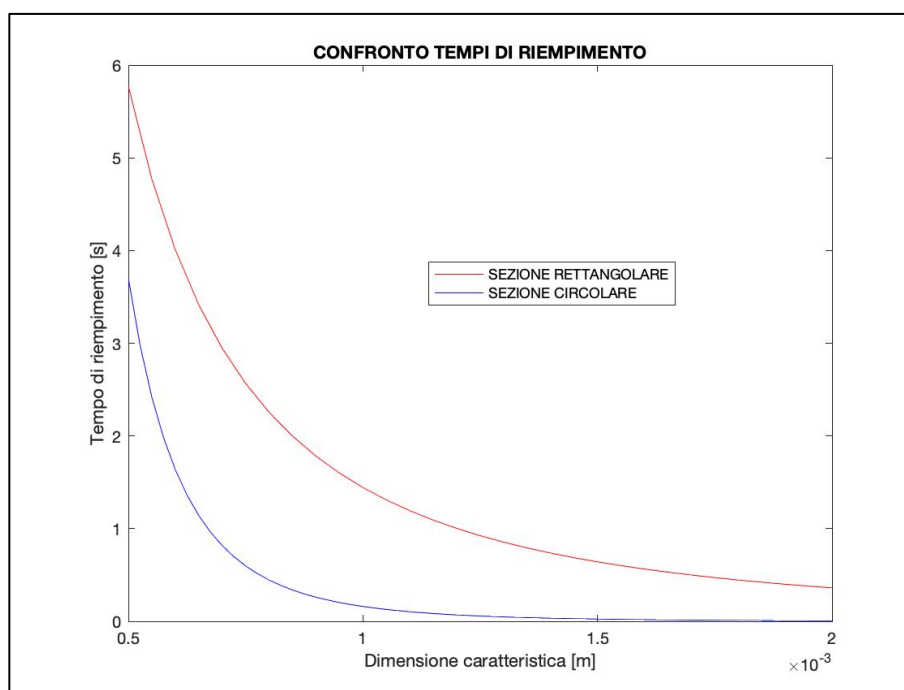


Grafico 5: Confronto dei tempi di riempimento fra canali con sezione circolare e sezione rettangolare. In questo caso, i tempi ricavati sono stati individuati ipotizzando l'accumulo di $30 \mu\text{L}$ all'interno di un canale riempito a partire dal basso.

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 [8].

Dunque, in ciascuna configurazione si è deciso di utilizzare canali circolari con raggio pari ad un valore massimo di 0.5mm in corrispondenza della valvola, in modo tale da rispettare la specifica di progetto appena citata.

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 6mm che, se confrontato con il diametro di 0.8mm utilizzato nei punti di accumulo a ridosso della valvola, garantisce un ΔH pari a circa 2600 μm , valore che rispetta le specifiche di progetto precedentemente descritte. L'efficacia di tale scelta è testimoniata dalla seguente immagine, la quale mostra come il volume di sangue in eccesso venga mantenuto all'esterno del tappo una volta che il componente è stato assemblato sul flacone, sia nel caso in cui venga riempito come componente preso singolarmente (Figura 43).



Figura 43: Immagine che mostra la capacità del tappo capillare di mantenere all'esterno della configurazione il volume di sangue in eccesso.

Per quanto riguarda il meccanismo di collegamento fra il tappo e il flacone, è stato mantenuto l'accoppiamento filettato fra i due componenti ed allo stesso modo, è stato mantenuto il collegamento filettato fra tappo e copri-tappo. 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. Se infatti questa operazione venisse effettuata prima dell'accoppiamento dei due componenti, durante la fase di avvvitamento si potrebbe verificare la fuoriuscita di sangue dal tappo dovuta alla pressione che si genera durante l'accoppiamento o a causa della pressione generata dalle dita dell'utente sul flacone mentre avviene il collegamento. 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 l'uniformità della 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). L'antigene utilizzato per questo tipo di controllo è riferito anche in questo caso allo standard NIBSC citato nel precedente capitolo. Il risultato è riportato qui di seguito (Figura 44).

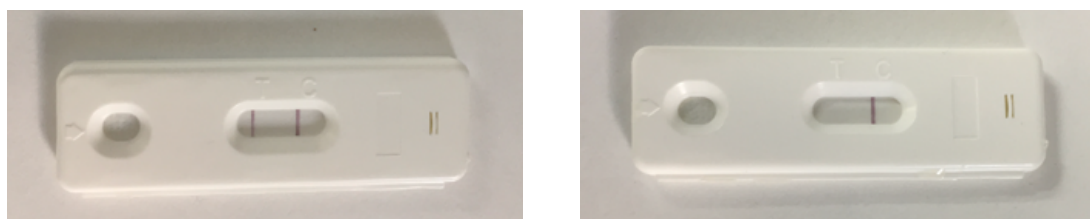


Figura 44: Immagini relative al controllo qualità delle membrane reattive.

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 e la letteratura scientifica utilizzata ha portato alla determinazione di 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 è stato deciso di simulare campioni positivi dotati di una concentrazione di PSA pari 7 ng/mL di sangue. In questo modo infatti, è possibile simulare dei campioni che, una volta depositati sulla membrana reattiva, sono in grado di restituire dei risultati caratterizzati da una banda test 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 quindi 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 attraverso il lettore immuno-cromatografico, delle membrane reattive trattate con la configurazione attualmente venduta azienda. La configurazione standard a cui si fa riferimento, 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 6):

CAMPIONI NEGATIVI CONFIGURAZIONE STANDARD				
VOLUME [μL]	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 [μL]	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 6: Raccolta dei dati ottenuti in termini di assorbanza sui test effettuati utilizzando il tappo capillare, rispettivamente sui campioni negativi e positivi.

Come già anticipato, questi dati sono stati utilizzati 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 45).



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 all'interno del campione prima del loro rilascio sulla membrana reattiva. Inoltre, questi test sono accompagnati da maggiori concentrazioni di oro colloidale e anticorpi depositati sulla membrana rispetto ai test non in pre-diluizione. Il test per PSA, così come quello per le IgE totali, non è stato progettato ipotizzando un approccio di questo tipo, dunque un sangue positivo a 7 ng/mL verrebbe eccessivamente diluito e l'antigene rilasciato sulla membrana sarebbe troppo poco per poter essere correttamente riconosciuto. 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 e per poter operare dei confronti diretti con la configurazione standard, i campioni positivi per la pre-diluizione sono stati realizzati in modo tale da riprodurre la concentrazione di PSA presente 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 il lettore di bande, essi sono stati riportati nelle seguenti tabelle (Tabella 7).

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μ L]	CONTROL LINE [mAbs]		TEST LINE [mAbs]	
	MEDIA	DEV. STD	MEDIA	DEV. STD.
60	345,5	62,2	14,3	9,1
90	338,6	35,5	17,8	7,8
120	179,4	49,6	20,7	10,2

CAMPIONI POSITIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μ L]	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 7: Dati relativi all'assorbanza valutata sui test standard.

Per prima cosa, è opportuno sottolineare come in nessuno dei casi appena analizzati si sia verificata emolisi visibile o dissociazione del marcato. Inoltre, facendo riferimento ai campioni positivi, la comparsa della banda test è stata rilevata in un tempo inferiore a 5 minuti, esattamente come avviene nel caso dei test standard. L'unico comportamento anomalo da sottolineare è quello dovuto alla comparsa della banda di controllo in tempi superiori a 30 secondi per volumi di soluzione pari a 60 μ L, cosa che tuttavia si verifica sia nel caso delle membrane trattate con il tappo capillare, sia nel caso della configurazione standard. Questo comportamento è giustificabile dalla scarsa capacità di movimento che caratterizza solitamente i bassi volumi di soluzione all'interno delle membrane considerate.

I dati riportati in precedenza 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 funzione del volume di soluzione depositata sulla membrana reattiva (Grafico 6).

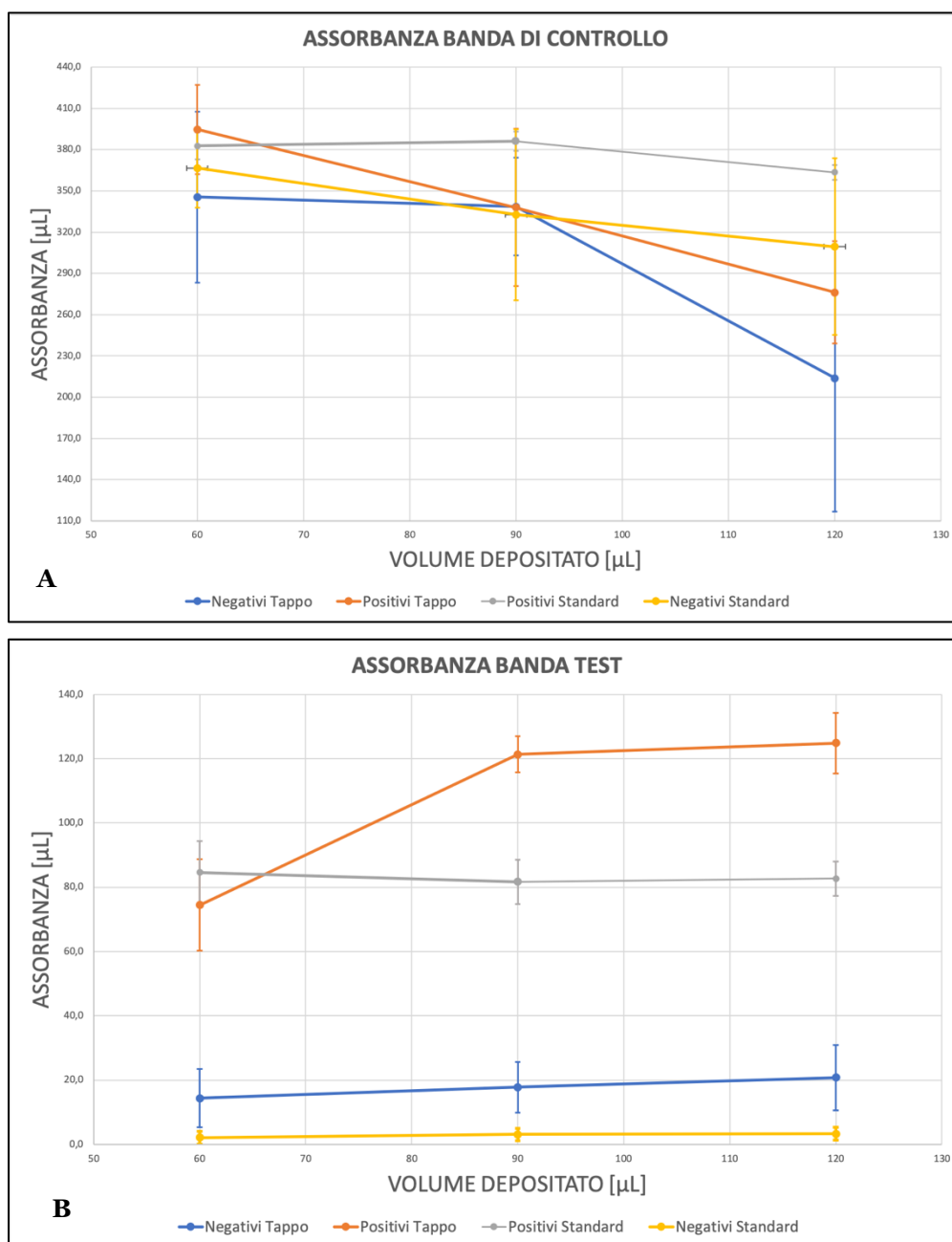


Grafico 6: Grafici che mostrano l'andamento dei valori di assorbanza nel caso di A) bande di controllo e B) bande test.

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 spiegato ipotizzando che, aumentando il volume di soluzione complessivamente depositata sulla membrana, si verifichi un aumento della portata all'interno della striscia. Questa condizione può aver portato ad una riduzione dell'efficienza con cui la soluzione di nano-particelle d'oro è in grado di interagire con gli anticorpi seminati sulla banda di controllo, favorendo dunque il loro trasporto verso il *wicking pad*. Inoltre, nel caso di un volume di soluzione pre-diluita 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. Le immagini fanno riferimento rispettivamente ad un campione positivo ed un campione negativo.

Le foto precedenti mostrano come, nel momento in cui sulla membrana venga depositata una quantità eccessiva di soluzione pre-diluita, il *pad* assorbente non sia in grado di trattenere tutto il volume in eccesso, riversandolo direttamente sulla porzione di nitrocellulosa. Questo fenomeno introduce una colorazione di background che può andare a ridurre il valore di assorbanza leggibile dallo strumento. Tale comportamento non è presente nel caso della configurazione standard, dal momento che in questo caso il volume in eccesso dispensato sulla striscia sarebbe unicamente composto da soluzione diluente, mentre nel caso del tappo capillare viene aggiunto un eccesso di sangue diluito. Questo fenomeno, in particolare nel caso del campione positivo riportato in precedenza, può inoltre rendere più difficile la lettura del risultato da parte dell'utente. Infatti, è possibile notare come la banda test appaia meno intensa rispetto a quelle mostrate in precedenza. 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. Infatti, nel caso del campione negativo riportato, il valore di assorbanza rilevato in corrispondenza della posizione della banda test è pari a 87 mAbs, valore ben al di sopra del valore medio rilevato nelle altre condizioni di campioni negativi. Infine, è opportuno ricordare come la comparsa di sangue sulla membrana in nitrocellulosa sia una condizione esteticamente non gradevole da vedere. Per tutti i motivi appena descritti, i test che hanno mostrato questo comportamento non sono stati considerati nell'analisi statistica dei valori di

assorbanza delle bande. Tuttavia, è da tenere in considerazione come l'aggiunta di un volume eccessivo di sangue diluito possa portare in alcuni casi alle condizioni appena osservate, evidenziando dunque una criticità legata alle specifiche di funzionamento del tappo capillare. Considerando ora i dati di assorbanza ottenuti relativamente alla 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 potenzialmente 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 relativamente ampia e di conseguenza, ipotizzando di ampliare la popolazione statistica, si potrebbe verificare una maggiore sovrapposizione fra le curve di negativi. 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 attraverso la prima goccia. 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.

Anche in questo caso è stato utilizzato lo stesso metodo di controllo delle membrane reattive presentato nel paragrafo precedente, il quale prevede la simulazione di un campione negativo depositando 90 μL di diluente sulla membrana, mentre il campione positivo è stato simulato utilizzando 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 IgE totali ad alta concentrazione (6750 UI/mL). La soluzione contenente IgE utilizzata per questo controllo di funzionalità è lo standard NIBSC citato nei precedenti capitoli. 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 47).



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 8) 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 8: 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 stato selezionato 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. Esattamente come nel caso del test per PSA, è stata calcolata la quantità di immunoglobuline da aggiungere al campione di sangue utilizzato come bianco in modo tale da poter riprodurre la concentrazione di riferimento 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 collezionato. Dunque, è stato utilizzato come base un campione di sangue negativo dotato di valori di assorbanza molto bassi, considerando la forte ipotesi che tale concentrazione possa essere considerata trascurabile rispetto alla concentrazione di riferimento. I risultati ottenuti in questo caso sono riportati nelle tabelle seguenti (Tabella 9):

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 9: 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):

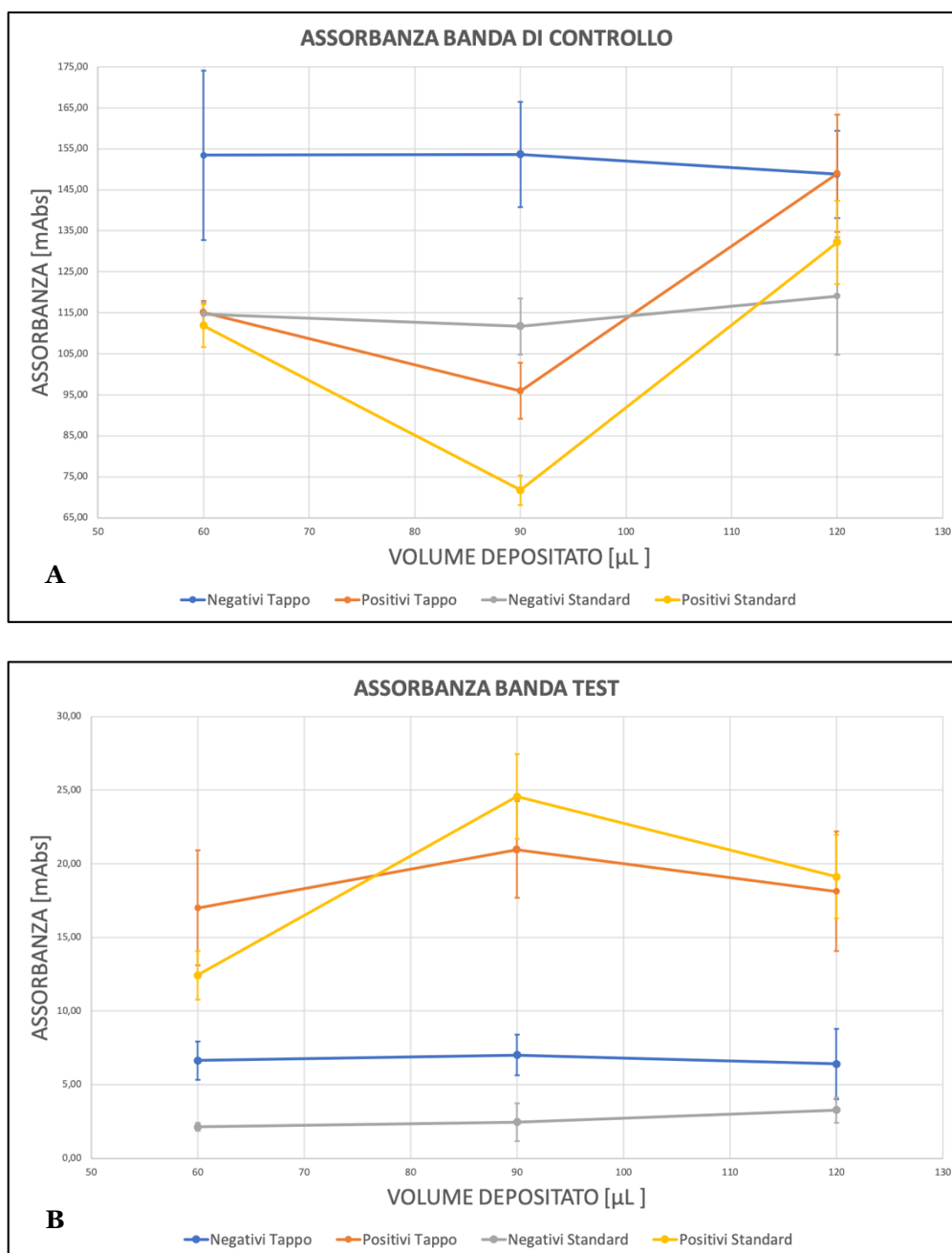


Grafico 7: Grafici che mostrano l'andamento dei valori di assorbanza nel caso di A) bande di controllo e B) bande test.

Anche in questo caso è possibile sottolineare come non si siano presentati in nessun caso fenomeni di emolisi e dissociazione del marcato, il tutto accompagnato dalla comparsa della banda test e della banda di controllo in un tempo inferiore a 5 minuti e 30 secondi rispettivamente. L'unica eccezione legata a questo aspetto è ancora una volta rappresentata dal maggiore tempo di comparsa della banda di controllo nel caso di un volume di soluzione totale pari a 60 μ L, giustificabile attraverso le stesse considerazioni già discusse nel precedente paragrafo. 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 spiegato, 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 esse siano caratterizzate da un andamento poco regolare. Sono infatti dotate di bande di errore relativamente elevate se confrontate con i valori medi, il tutto accompagnato da un andamento di difficile interpretazione. Tuttavia, anche in questo caso è possibile affermare che le bande di controllo, in alcuni casi, siano dotate di un'intensità omogenea fra le varie condizioni. Considerando ora le bande test, 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, i test che sono stati trattati con il primo metodo sono caratterizzati da bande più intense, anche se con una differenza meno netta rispetto al test per PSA. La maggiore intensità dei dati ottenuti in seguito all'utilizzo del tappo capillare 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 minimizzare lo spessore del chip e la colonna di fluido agente sulle rispettive valvole capillari, sono stati progettati con una sezione resistente variabile. Nello specifico, il raggio iniziale è stato impostato pari a 0.9mm mentre il secondo raggio, ovvero quello che si affaccia sulla valvola capillare, è pari a 0.4 mm per i motivi già evidenziati nei paragrafi precedenti. Il meccanismo di sblocco della valvola capillare avviene attraverso la deposizione della soluzione diluente all'interno dell'apposito pozzetto. Successivamente, il diluente comincia a fluire all'interno del canale che permette di collegare il pozzetto con la membrana reattiva. Scorrendo in questa porzione, entra in contatto con le valvole capillari utilizzate per bloccare il volume di sangue necessario per il test, garantendone il rilascio. Dal punto di vista delle dimensioni, il canale che collega membrana reattiva e pozzetto è caratterizzato da uno spessore di 0.8mm e una larghezza di 5mm. Tale scelta è stata fatta per garantire l'inserimento della striscia reattiva all'interno del dispositivo. 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 48), 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.

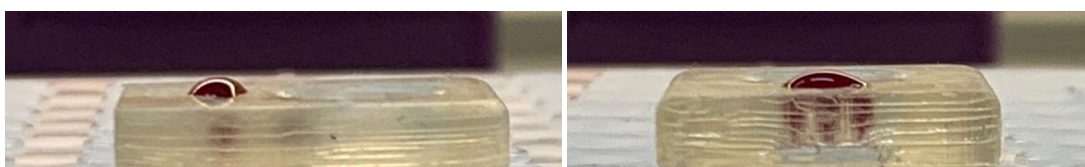


Figura 48: Immagine laterale e frontale del dispositivo che mostrano la capacità della valvola capillare di trattenere solo il volume di sangue necessario per il test.

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 10) e il loro andamento è stato infine confrontato con i dati ottenuti utilizzando la configurazione standard (Grafico 8) riportati nei precedenti paragrafi.

CAMPIONI NEGATIVI NUOVA CONFIGURAZIONE				
VOLUME [μ L]	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 [μ L]	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 10: Tabelle riassuntive dei dati ricavati durante l'analisi di assorbanza di campioni positivi e negativi al test per PSA.

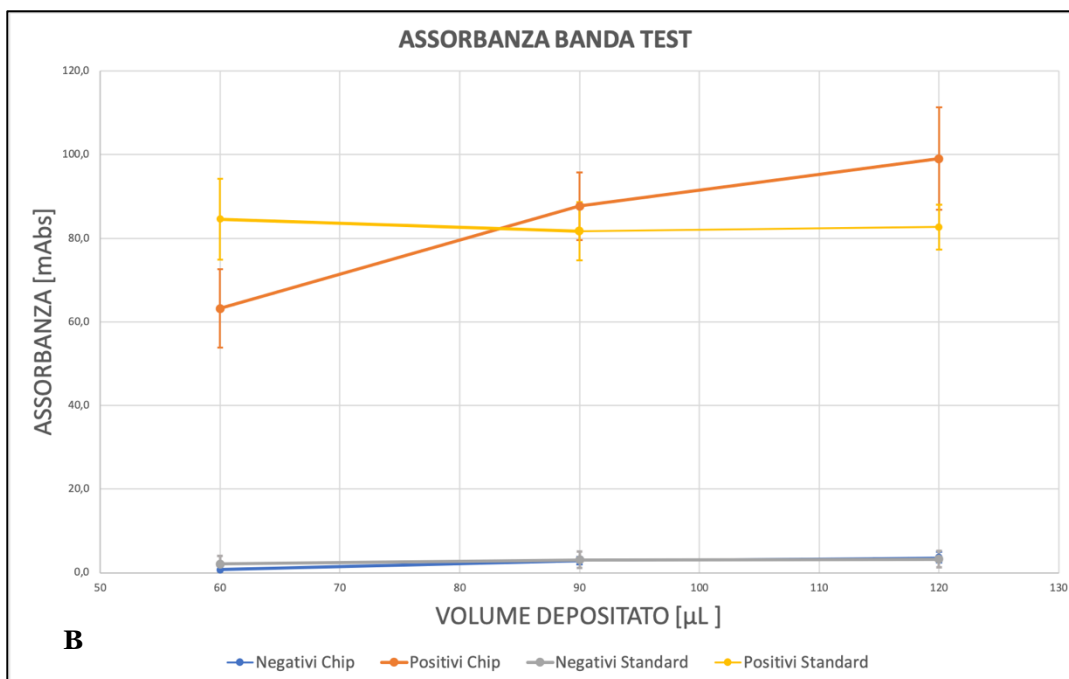
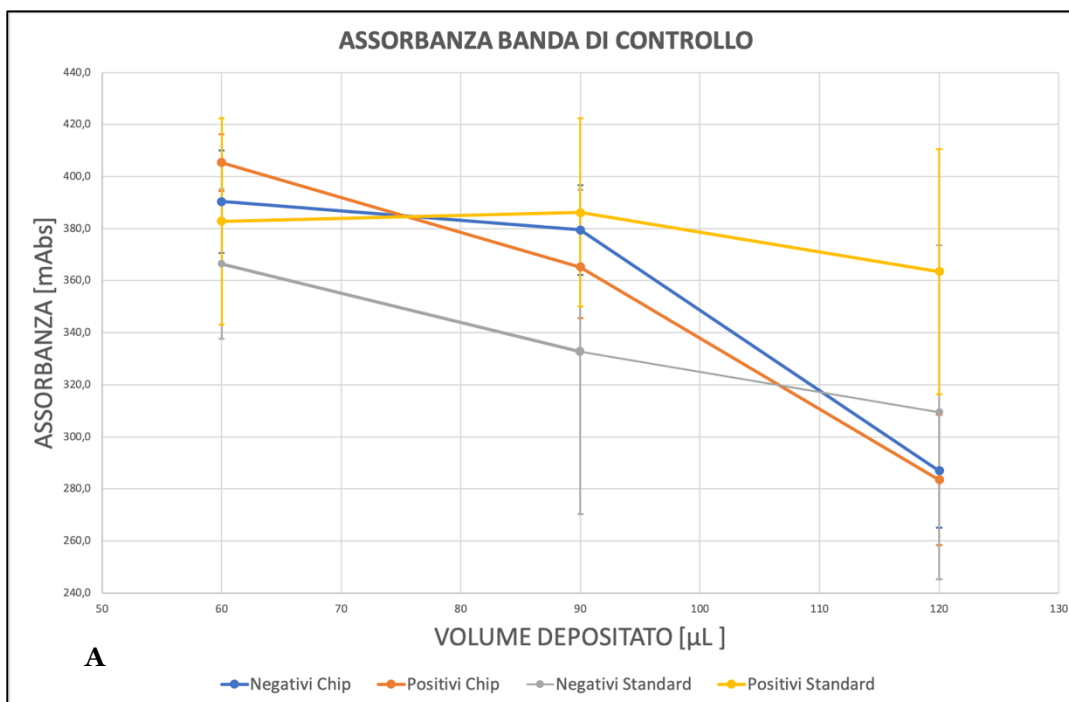


Grafico 8: Grafici che mostrano l'andamento dei valori di assorbanza nel caso di A) bande di controllo e B) bande test.

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 risultino 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. Analizzando più nel dettaglio i dati, 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 prima di giungere alla membrana reattiva. Nel momento in cui ci si trovi ad utilizzare un ridotto volume di diluente, quello che si può verificare in questo caso è una lenta migrazione di quest'ultimo verso la membrana reattiva. Tale comportamento non garantirebbe dunque le corrette forze di trascinamento sul sangue bloccato attraverso le valvole capillari. Di conseguenza, non sarebbe garantito il trasporto verso la membrana reattiva del corretto volume di campione, il quale rimarrebbe in parte nei canali di raccolta, in parte all'interno del canal di collegamento. 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 90 μL e 120 μL 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.

3.5.2 Test per IgE totali

Dal momento che non è prevista nemmeno in questo caso una pre-diluizione, 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 11) 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 11: Tabelle contenenti i dati relativi al chip capillare applicato al test per IgE totali, rispettivamente per campioni negativi e campioni positivi.

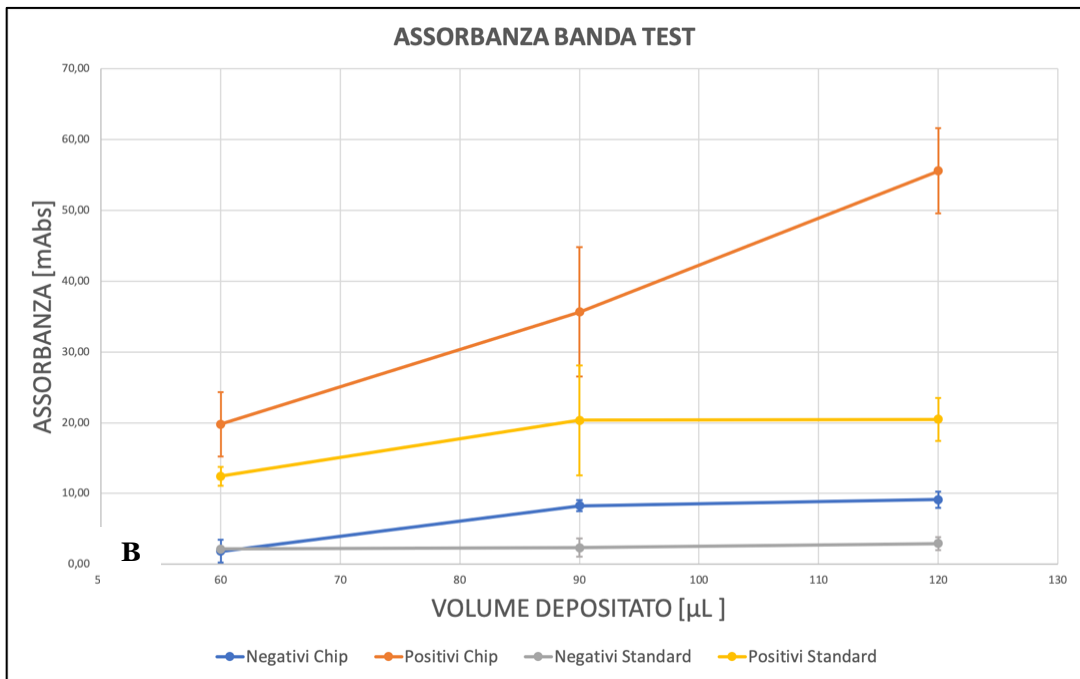
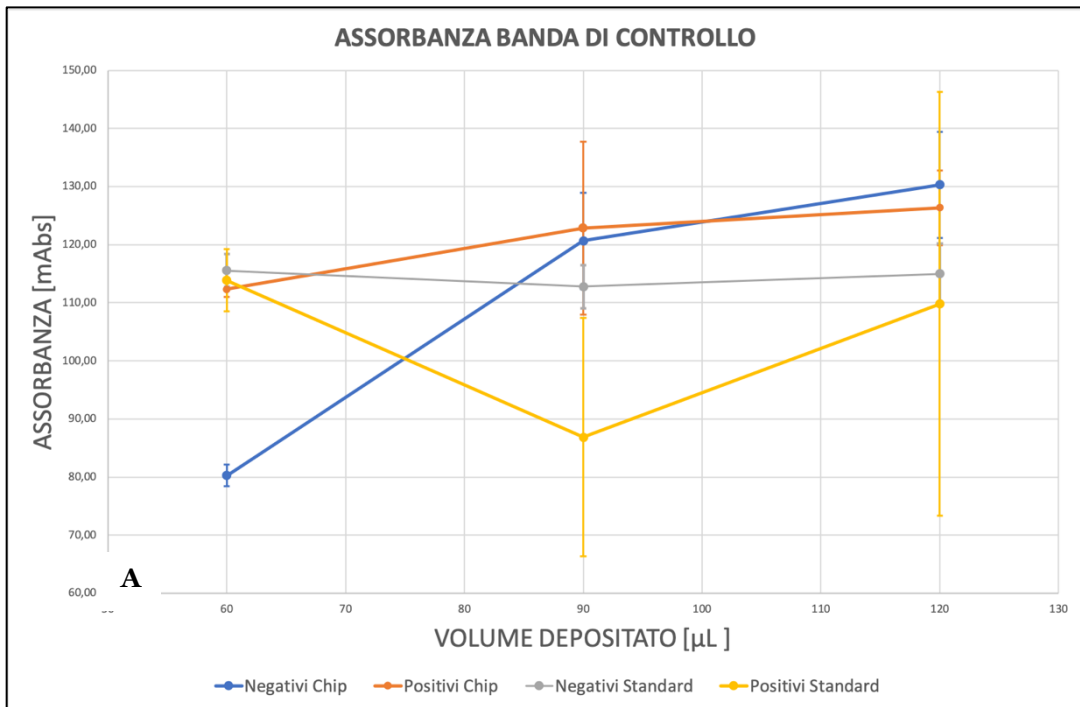


Grafico 9: Grafici che mostrano l'andamento della banda di controllo e della banda test nelle configurazioni analizzate.

Osservando la distribuzione dei valori di assorbanza delle bande di controllo, i risultati suggeriscono sia un'uniformità in termini di intensità fra le varie condizioni, sia un comportamento stabile di tali valori al variare del volume di soluzione globale rilasciata sulla membrana. Quest'ultimo aspetto può essere spiegato ipotizzando che, nel caso di soluzioni di nano-particelle d'oro dotate di bassa concentrazione, per poter ottenere delle variazioni macroscopicamente visibili sono necessarie delle variazioni di volume maggiori rispetto a quelle considerate. Nel caso del test per PSA invece, la variazione di intensità delle bande di controllo potrebbe quindi essere più evidente per via dell'alta concentrazione di nano-particelle che la caratterizza. Tornando al test per IgE, l'unico aspetto anomalo evidenziato per quanto riguarda le bande di controllo è presente nel caso dei campioni negativi dotati di un volume totale di soluzione pari a 60 μL . Ciò può essere dovuto alla difficoltà con cui i bassi volumi di soluzione scorrono verso la membrana reattiva. Infine, considerando l'andamento dei valori di assorbanza delle bande test, anche in questo caso è possibile evidenziare una netta similitudine dei campioni negativi trattati attraverso le due condizioni, mentre non si può dire altrettanto per la distribuzione delle assorbanze dei test positivi. In questo caso infatti, all'aumentare del volume di soluzione, è stato riscontrato un aumento monotono della visibilità della banda nel caso delle membrane trattate con chip capillare. Inoltre, la presenza di barre d'errore relativamente basse suggerisce che la differenza di comportamento fra le due popolazioni di positivi sia da imputare alla scarsa numerosità dei campioni utilizzati. Tale comportamento può essere spiegato ipotizzando che all'interno del canale posto a monte della membrana reattiva, prima che sangue e diluente vengano rilasciati su di essa, si verifichino fra i due fluidi di fenomeni di interazione che per certi versi somigliano ad una sorta di pre-diluizione, andando quindi ad isolare in maniera più ottimale l'antigene di interesse. Tale ipotesi è ulteriormente avvalorata dalla seguente immagine (Figura 48).

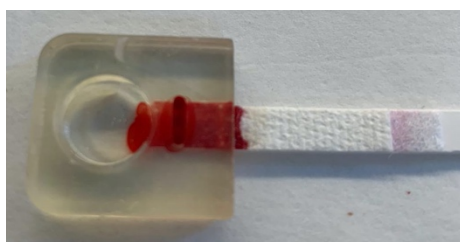
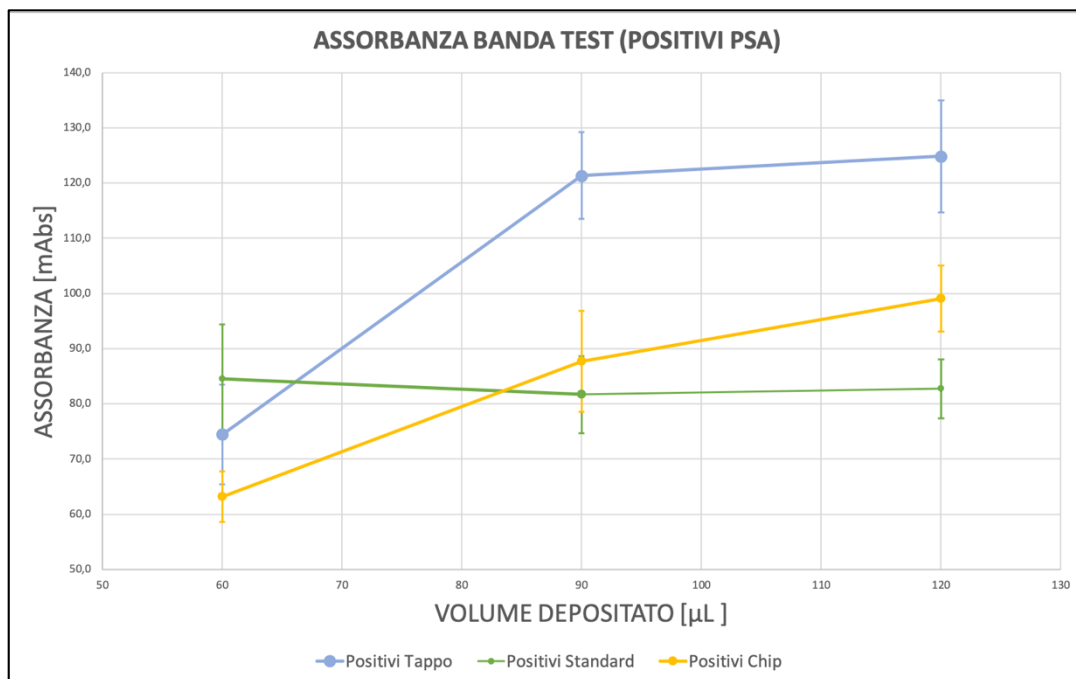


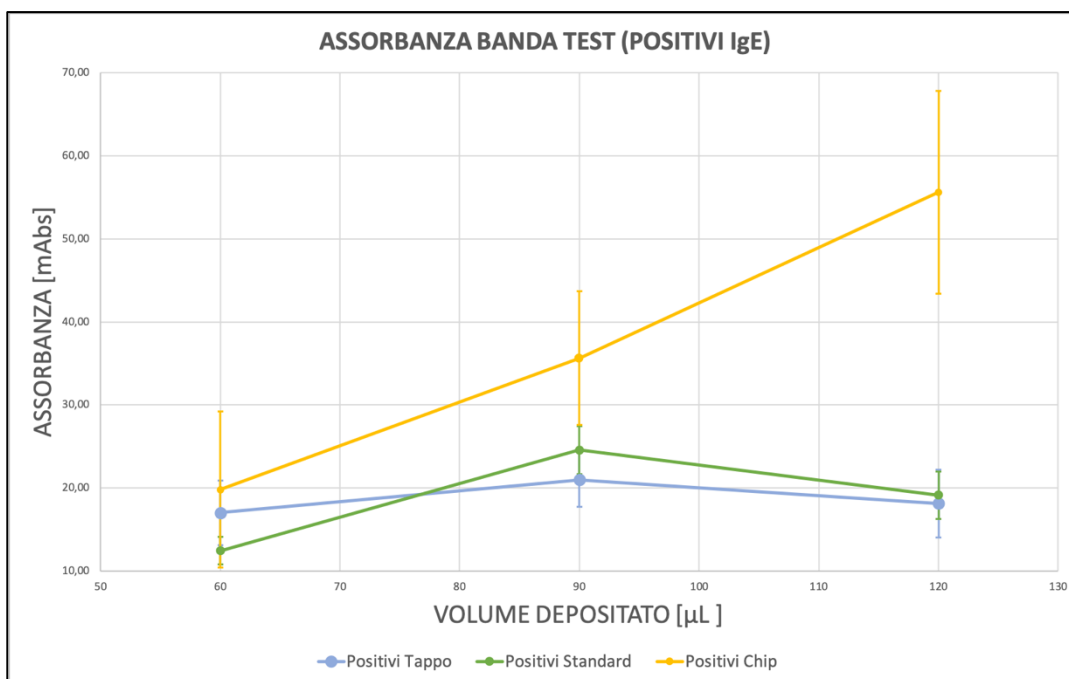
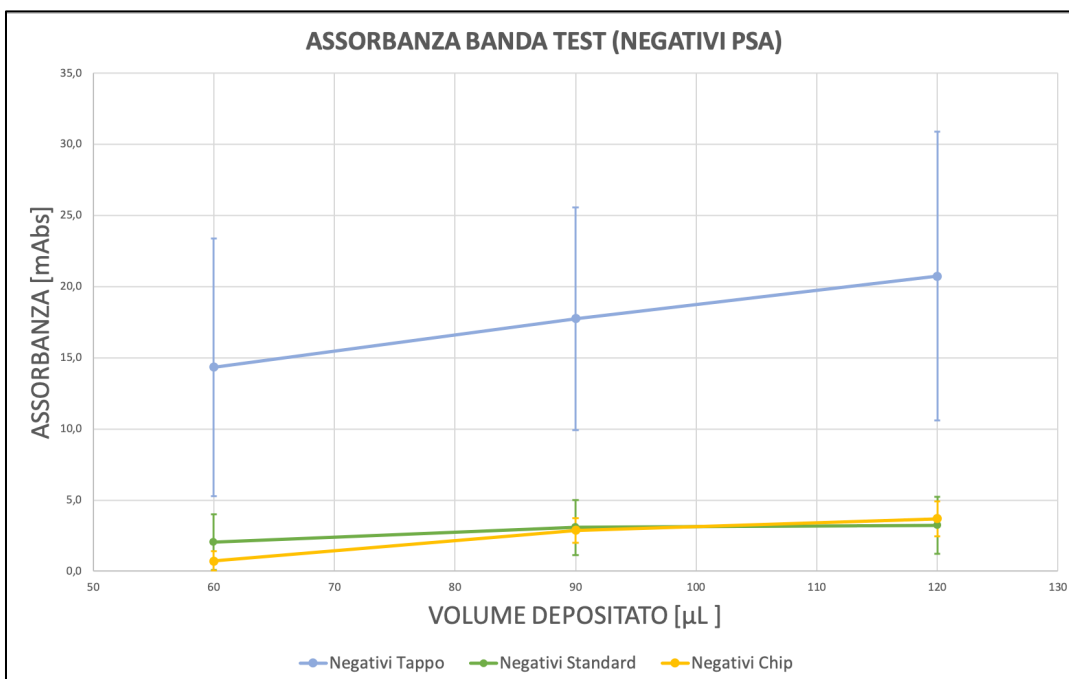
Figura 49: Immagine che mostra fenomeni di flusso retrogrado rispetto alla membrana reattiva nel caso della deposizione di 90 μL di soluzione diluente.

Come è possibile notare dalla precedente immagine, l'aggiunta di un eccessivo volume di soluzione diluente porta ad un fenomeno di flusso retrogrado di sangue diluito. Questa condizione, oltre ad essere un fenomeno indesiderato e necessario da risolvere, può aver portato allo stato di pre-diluizione a cui si è fatto riferimento in precedenza. Tuttavia, la precedente affermazione è solamente un'ipotesi che deve essere ulteriormente esplorata aumentando la popolazione campionaria o ripetendo l'esperimento.

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).





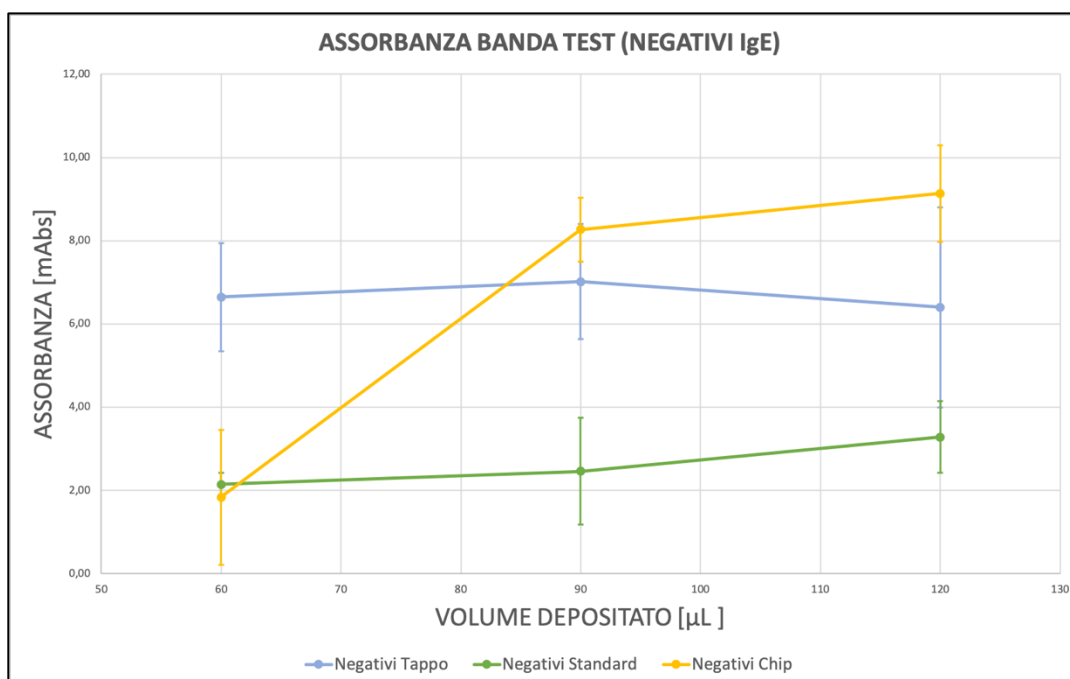


Grafico 10: Grafici relativi ai confronti fra i valori di assorbanza del test standard e quelli ottenuti con le due nuove configurazioni.

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 bande visibili, seppur in maniera molto tenue. In casi estremi, ipotizzando di avere dei campioni negativi caratterizzati da una concentrazione di antigene superiore rispetto a quella sperimentata fino a questo punto, la configurazione che sfrutta la presenza del tappo capillare potrebbe portare alla comparsa di falsi positivi. Infine, ricordando che la configurazione attualmente utilizzata per entrambi i test si basa sull'utilizzo di 30 µL di sangue accompagnati da 60 µL di diluente, si ritiene opportuno sottolineare come la condizione in cui vengano dispensati 60 µL totali di soluzione difficilmente si presenta nel momento in cui il test viene svolto da un generico utente. Dunque, i dati ottenuti su tutti i test mediante quest'ultima configurazione sono stati utilizzati semplicemente per determinare un andamento dei valori di assorbanza e le criticità precedentemente evidenziate in questi casi non devono essere necessariamente considerati come dei limiti legati a ciascuna configurazione.

Per confrontare in maniera definitiva il tappo e il chip capillare, 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 12).

CONFRONTO CON REQUISITI DI PROGETTO		
REQUISITO DI PROGETTO	TAPPO CAPILLARE	CHIP CAPILLARE
Eliminazione micro-pipetta	In entrambi i casi, la micro-pipetta capillare è stata sostituita da un componente integrabile negli oggetti già presenti all'interno del kit venduto dall'azienda. Per questo motivo, tale requisito di progetto viene considerato raggiunto.	
Meccanismo di controllo di volume	In entrambi i casi, è stata individuata una configurazione che sfrutta la presenza della valvola capillare a due livelli per garantire il controllo di volume di sangue in maniera passiva. Per questo motivo, tale requisito di progetto viene considerato raggiunto.	
Brevettabilità	Avendo utilizzato alla base della progettazione un principio ben noto dalla letteratura scientifica, è possibile ricavare un modello di utilità ma non un brevetto. Inoltre, questo aspetto è da approfondire ulteriormente in seguito ad una nuova analisi brevettuale, in modo da considerare i dispositivi brevettati in periodi più recenti.	
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, è lecito supporre di poter fare lo stesso con i nuovi componenti sperimentati. Anche questo requisito resta tuttavia da valutare in maniera più approfondita una volta individuato il design finale di entrambe le configurazioni.	
Contenimento costi	Nonostante sia stato eliminato un componente dal kit attuale, è opportuno ricordare come sia necessario un cambio di materiale per poter sfruttare efficacemente le caratteristiche di questa configurazione. Quindi, dovrà essere valutata in futuro la variazione in termini di costi che accompagna una scelta di questo tipo.	Nonostante sia stato eliminato un componente dal kit attuale, in questo specifico caso oltre ad una variazione del materiale da utilizzare deve anche essere introdotta una variazione in termini di volume. Infatti, rispetto alla cassetta in HDPE attualmente utilizzata, questa configurazione è caratterizzata da una maggiore lunghezza. Queste due variazioni da introdurre possono quindi portare ad un incremento potenziale dei costi, andando quindi a compensare la rimozione dei costi fissi legati all'acquisto della micro-pipetta.
Sicurezza del kit	In questo caso, la sicurezza della configurazione è maggiore rispetto al kit attualmente utilizzato, dal momento che il campione di sangue prelevato rimane confinato all'interno del flacone in forma diluita. Questa caratteristica permette più che altro di aumentare la sicurezza per i soggetti che si trovano a contatto con l'utilizzatore.	In questo caso, la sicurezza per l'utilizzatore e per le persone a contatto con esso rimane praticamente invariata rispetto alla configurazione standard, dal momento che il volume di sangue prelevato resta comunque esposto sulla superficie del 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. Dunque, questo requisito viene considerato raggiunto.	
Impatto sull'attendibilità del test	Il tappo capillare, come mostrato durante la trattazione, evidenzia la presenza di alcuni aspetti critici che devono essere analizzati in maniera più approfondita. Dunque, questo requisito di progetto resta in una condizione di valutazione.	Il chip capillare sembrerebbe essere caratterizzato da un funzionamento analogo al test standard. Tuttavia, è opportuno ampliare la popolazione campionaria per poterlo affermare con certezza. Inoltre, è necessario eliminare i fenomeni di flusso retrogrado evidenziati.
Mantenere processo di produzione	Il tappo capillare prevede l'uso di un flacone termosaldato, dunque è necessario introdurre un ulteriore passaggio durante il processo produttivo che porta alla creazione del prodotto finito. Pertanto, è opportuno valutare la fattibilità di questa modifica sia in termini di costi che in termini di operatività.	Il chip capillare, oltre alla rimozione della micro-pipetta dal kit venduto, non porta con sé ulteriori modifiche. Per questo motivo, è ragionevole supporre per il momento che non debbano essere prese in considerazione nuovi passaggi dal punto di vista produttivo.

Tabella 12: 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, dal momento che questo fenomeno potrebbe portare all'impossibilità di accedere al volume di campione raccolto;
- Sperimentazione su una popolazione campionaria più ampia composta da campioni reali. In questo modo, sarebbe possibile analizzare più nel dettaglio la sensibilità e la specificità dei test una volta modificato il kit;
- Sperimentazione su materiali da prodotto finito, come ad esempio PMMA e policarbonato, in modo tale da analizzare l'effettivo comportamento della valvola capillare nei confronti del sangue. In questo modo, sarebbe possibile anche andare ad eliminare eventuali comportamenti legati alla morfologia superficiale vista in questa sperimentazione;
- Adattabilità dei dispositivi al processo di stampaggio per iniezione ed eventuali modifiche di funzionalità dovute alle tolleranze di lavorazione;

- Valutazione della possibilità di rendere modulari entrambe le configurazioni, in modo tale da ottenere un dispositivo adattabile a differenti volumi di campione e rapporti di diluizione. Ciò porterebbe anche alla necessità di un solo stampo ad iniezione;
- Valutazione della facilità di utilizzo da parte di un generico utente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Posthuma-Trumpie, J. Korf e A. Van Merongen, «Lateral Flow (immuno)assay: its strenghts, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 2, n. 393, pp. 569-582, 2009.
- [2] K. Ching, «Lateral Flow Immunoassay,» in *ELISA*, 2015, pp. 127-137.
- [3] K. Kozcula e A. Gallotta, «Lateral flow assay» in *Essays in Biochemistry*, 2016, pp. 111-120.
- [4] G. Candiani, *Corso di Bioreattori e Biotecnologie*, 2019.
- [5] NanoComposix, «Lateral Flow Assay Development Guide» vol. 14, pp. 1-41, 2018.
- [6] V. Tukmachev, L. Nedospasova, B. Zaslavskii e S. Roghozin, «Effect of sodium dodecyl sulfate on biological membranes» *Biofizika*, vol. 24, n. 1, pp. 55-60, 1979.
- [7] C. C. Domingues, A. Ciana, A. Buttafava, C. Balduini, E. De Paula e G. Minetti, «Resistance of Human Erythrocyte Membranes to Triton X-100 and C12E8,» *Journal of Membrane Biology*, n. 227, pp. 39-48, 2009.
- [8] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia e D. Juncker, «Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillaric circuits» *Royal Society of Chemistry*, 2018.

-
- [9] M. Dong, J. Wu, Z. Ma, H. Peretz-Soroka, M. Zhang, P. Komenda, N. Tangri, Y. Liu, C. Rigatto e F. Lin, «Rapid and Low-Cost CRP Measurement by Integrating a Paper-Based Microfluidic Immunoassay with Smartphone (CRP-Chip)» *Sensors*, vol. 4, n. 17, 2017.
- [10] S. Smith, D. Mager, A. Perebikovskiy, E. Shamloo, D. Kinahan, R. Mishra, S. T. Delgado, H. Kido, S. Saha, J. Ducreé, M. Madou e J. Krivink, «Micromachines» vol. 7, n. 22, 2016.
- [11] C. H. Weng, Y. L. Kang, Y. Y. Sung e B. L. Gwo, «A suction-type, pneumatic microfluidic device for liquid transport and mixing,» in *Microfluidics and Nanofluidics*, Springer-Verlag, 2011, pp. 303-310.
- [12] M. Zimmermann, P. Hunziker e M. Delamarche, «Valves for autonomous capillary systems» vol. 5, pp. 395-402, 2008.
- [13] M. Hitzbleck, L. Avrain, V. Smekens, R. D. Rovchik, P. Mertens e E. Delamarche, «Capillary soft valves for microfluidics» *Lab on Chip*, vol. 11, pp. 1972-1978, 2012.
- [14] K. Sugioka, J. Xu, D. Wu, Y. Hanada, Z. Wang, Y. Cheng e K. Midorikawa, «Femtosecond laser 3D micromachining: a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass» *Lab on Chip*, vol. 18, pp. 3447-3458, 2014.
- [15] V. A. Papadimitriou, L. I. Segerink, A. Van Den Berg e C. T. Eijkel J., «3D capillary stop valves for versatile patterning inside microfluidic chips» *Analytica Chimica Acta*, 2017.
- [16] T. S. Leu e P. Y. Chang, «Pressure barrier of capillary stop valves in micro sample separators» *Elsevier*, n. 115, pp. 508-515, 2004.
- [17] A. Glière e D. C., «Modeling and fabrication of capillary stop valves for planar microfluidic systems» 2006.
- [18] R. Seemann, M. Brinkmann, E. J. Kramer, F. Lange F e R. Lipowsky, «Wetting morphologies at microstructured surfaces» *PNAS*, vol. 102, n. 6, pp. 1848-1852, 2005.

- [19] L. Torrisi e C. Scolaro, «Blood Wettability of Haemocompatible Carbon-based Materials» *Journal of Advanced Chemical Engineering*, vol. 7, n. 2, pp. 1-6, 2017.
- [20] J. Melin, H. Roxhed, G. Gimenez, P. Griss, W. van der Wijngaart e G. Stemme, *Sensor and Actuators*, 2004.
- [21] P. F. Man, C. H. Mastrangelo, M. A. Burns e T. Burke D., «Microfabricated capillarity-driven stop valve and sample injector» *MEMS'98*, vol. 66, 1998.

A.1 Script Matlab

A.1.1 Riempimento canale cilindrico

```

% RIEMPIMENTO DALL'ALTO DI UN CANALE CIRCOLARE

% PARAMETRI FISICI
mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido [Pa x s]
ro = 1054;          % Densità fluido [Kg/m^3]
g = 9.8;           % Accelerazione di gravità [m/s^2]
gamma = 62*10^-3;  % Tensione superficiale [N/m]
teta = 0.976;      % Angolo di contatto [rad]
V = 3 * 10^-8;     % Volume totale [m^3]

% 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 = ((r*gamma*cos(teta))/(2*mu));
    k_2 = (ro*g*(r^2))/(8*mu);

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

    % Funzione tempo di riempimento
    t_fill = @(r) (l/k_2) - (A.*log(1 + B*l));

    % Funzione pressione capillare
    dp = @(r) (4*gamma*cos(teta))/r;

    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 [s]');

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]');

```

```

% RIEMPIMENTO DAL BASSO DI UN CANALE CIRCOLARE

% PARAMETRI FISICI
mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido [Pa x s]
ro = 1054;          % Densità fluido [Kg/m^3]
g = 9.8;           % Accelerazione di gravità [m/s^2]
gamma = 62*10^-3;  % Tensione superficiale [N/m]
teta = 0.976;      % Angolo di contatto [rad]
V = 3 * 10^-8;     % Volume totale [m^3]

% PARAMETRI GEOMETRICI
r_v = [1:0.05:2]'.*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 = ((r*gamma*cos(teta))/(2*mu));
    k_2 = (ro*g*(r^2))/(8*mu);

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

    if (1 <= k_1/k_2)

    % Funzione tempo di riempimento
    t_fill = @(r) -(l/k_2) - (A.*log(1 - B*l));

    % Funzione pressione capillare
    dp = @(r) (4*gamma*cos(teta))/r;

    t_v(i) = t_fill(r);
    dp_v(i) = dp(r);
    end
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 [s]');

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

```

% RIEMPIMENTO DAL BASSO DI UN CANALE RETTANGOLARE

% PARAMETRI FISICI
mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido [Pa x s]
ro = 1054;          % Densità fluido [Kg/m^3]
g = 9.8;           % Accelerazione di gravità [m/s^2]
gamma = 62*10^-3;  % Tensione superficiale [N/m]
teta = 0.976;      % Angolo di contatto [rad]
V = 3 * 10^-8;     % Volume totale [m^3]

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

% CICLO ITERATIVO PER CALCOLO DEI PARAMETRI
for i = 1:length(h_v)
for j = 1:length(w_v)
    h = h_v(i);      % Spessore canale [m]
    w = w_v(j);      % Larghezze canale [m]
    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)));

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

    % Funzione tempo di riempimento
    t_fill = @(h,w) (1/k_2 - A.*log(1 + B*1));

    % Funzione pressione capillare
    dp = @(h,w) (4*gamma*cos(teta)*(w+h))/(w*h);

    % Matrice pressioni capillari
    dp_mat(i,j) = dp(h,w);

    % Matrice tempi di riempimento
    t_fill_mat(i,j) = t_fill(h,w);

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]');

```

```

% RIEMPIMENTO DAL BASSO DI UN CANALE RETTANGOLARE

% PARAMETRI FISICI
mu = 3.5*10^-3;      % Viscosità fluido [Pa x s]
ro = 1054;          % Densità fluido [Kg/m^3]
g = 9.8;           % Accelerazione di gravità [m/s^2]
gamma = 62*10^-3;  % Tensione superficiale [N/m]
teta = 0.976;      % Angolo di contatto [rad]
V = 3 * 10^-8;     % Volume totale [m^3]

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

% CICLO ITERATIVO PER CALCOLO DEI PARAMETRI
for i = 1:length(h_v)
for j = 1:length(w_v)
    h = h_v(i);      % Spessore canale [m]
    w = w_v(j);      % Larghezze canale [m]
    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)));

    if (l <= k_1/k_2)
        A = k_1/(k_2^2);
        B = k_2/k_1;

        % Funzione tempo di riempimento
        t_fill = @(h,w) - (1/k_2 - A.*log(1 - B*1));

        % Funzione pressione capillare
        dp = @(h,w) (4*gamma*cos(teta)*(w+h))/(w*h);

        % Matrice pressioni capillari
        dp_mat(i,j) = dp(h,w);

        % Matrice tempi di riempimento
        t_fill_mat(i,j) = t_fill(h,w);

    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]');

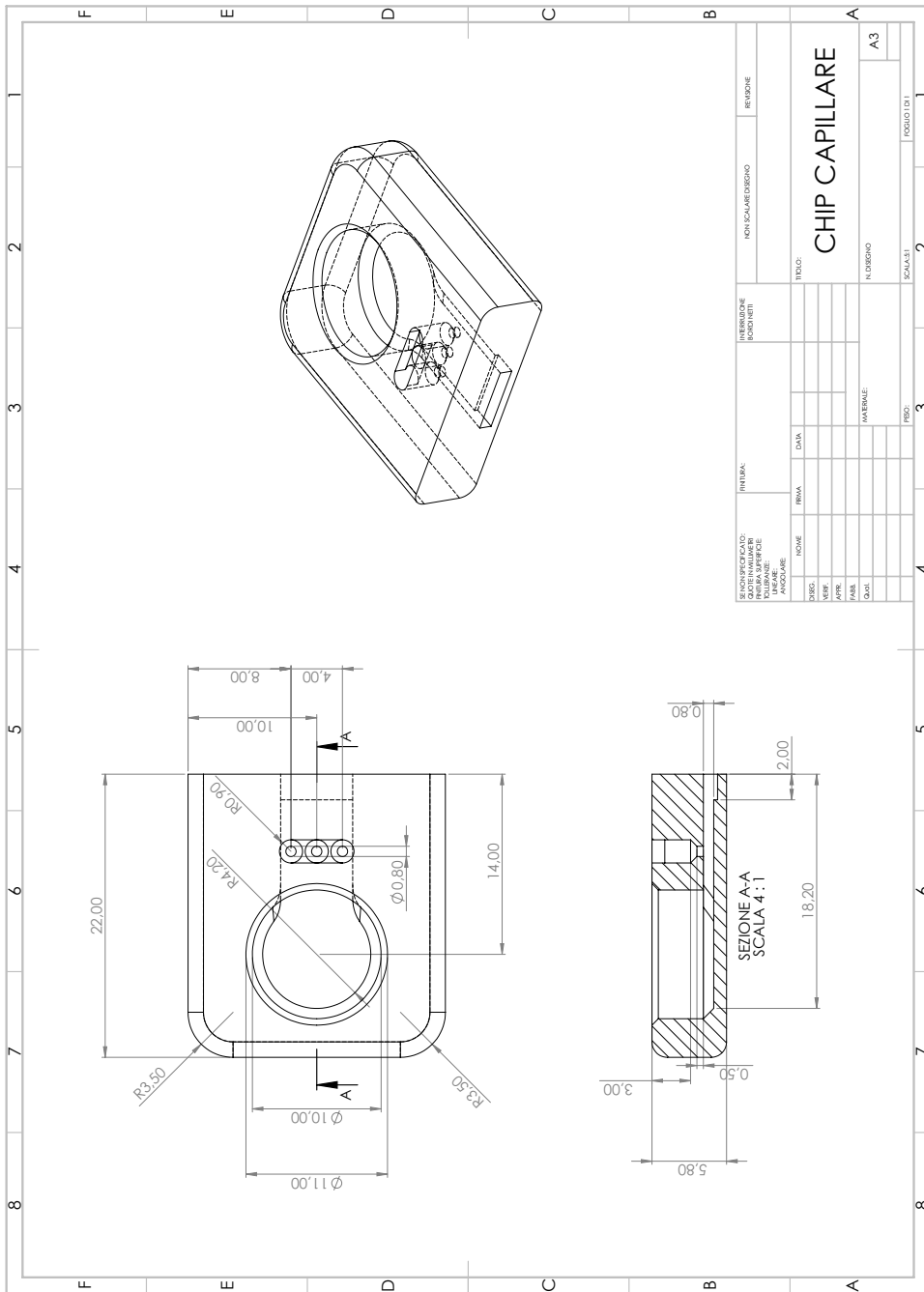
figure(3)
mesh(w_v, h_v, dp_mat);
title('Pressione vs Dimensioni');
xlabel('Larghezza [m]');
ylabel('Spessore [m]');
zlabel('Pressione [Pa]');

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

```

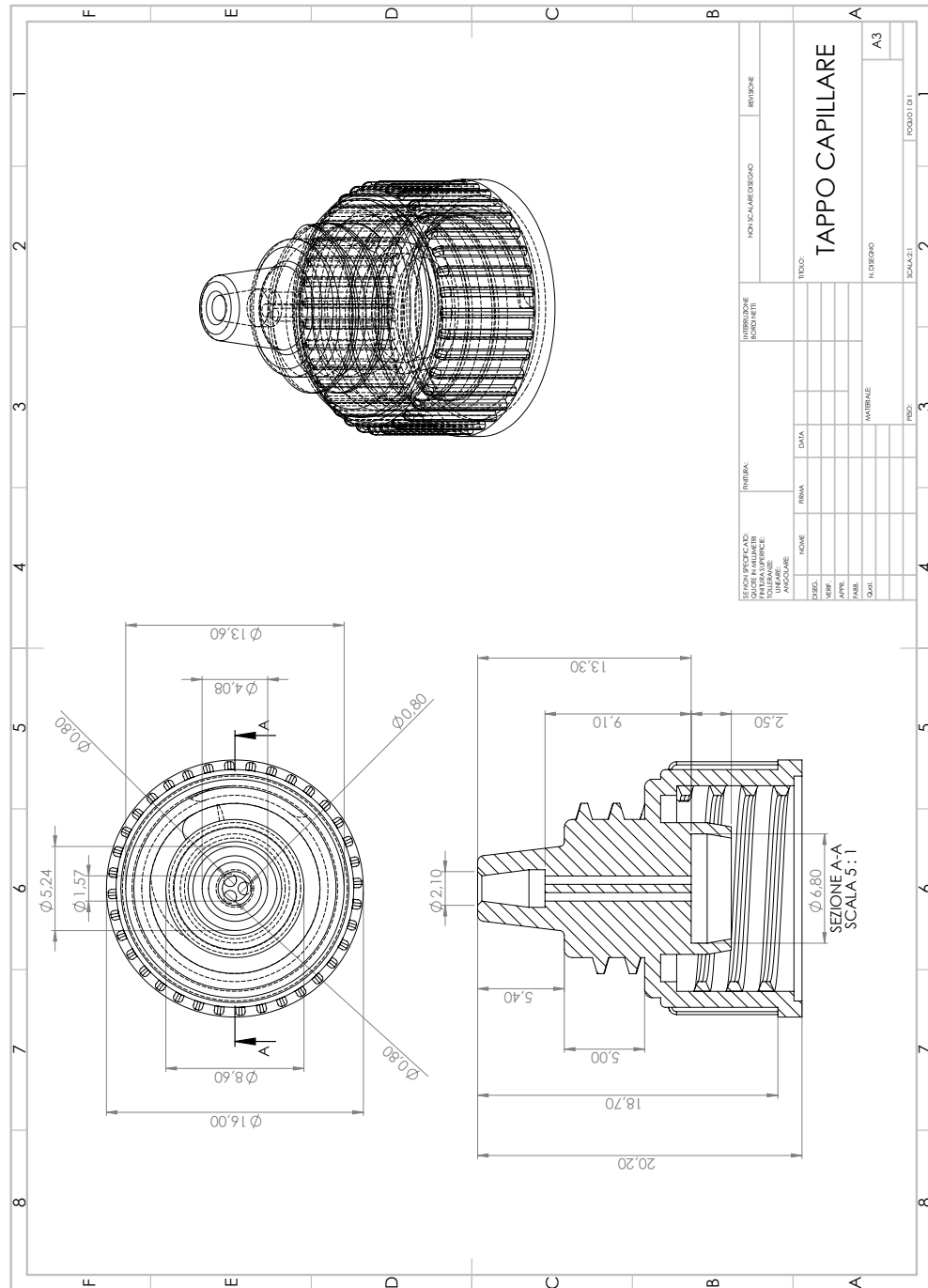
A.2 Disegni meccanici

A.2.1 Chip capillare



SOLIDWORKS Educational Product. Solo per uso didattico.

A.2.2 Tappo capillare



SOLIDWORKS Educational Product. Solo per uso didattico.

A.3 Calcoli numerici

A.3.1 Simulazione dei campioni positivi nei test senza pre-diluizione

Come spiegato nelle sezioni precedenti, sia per il test su PSA che per il test su IgE sono stati utilizzati dei campioni di sangue negativi, ipotizzando che all'interno di essi la concentrazione di antigene sia trascurabile. Fissata la concentrazione che si vuole raggiungere, conoscendo la composizione della *vial* da cui viene prelevato l'antigene, è possibile determinare il volume che deve essere prelevato da quest'ultima per poter ottenere il risultato prefissato. Il calcolo di questo volume si basa sulla seguente equazione:

$$C_T = \frac{V_S \cdot C_S + V_V \cdot C_V}{V_S + V_V}$$

Dove:

- C_T = Concentrazione *target* che si vuole raggiungere;
- V_S = Volume di sangue utilizzato;
- C_S = Concentrazione dell'antigene all'interno del volume di sangue;
- V_V = Volume di soluzione prelevato dalla *vial*;
- C_V = Concentrazione dell'antigene all'interno della *vial*;

Ipotizzando dunque che la concentrazione di antigene all'interno del sangue sia pari a zero, è possibile ricavare il valore di V_V necessario a positivizzare un volume prefissato di campione secondo la seguente formula.

$$V_V = \frac{C_T \cdot V_S}{(C_V - C_T)}$$

Questa formulazione può essere utilizzata sia nel caso del test per PSA che nel caso del test per IgE. Ad esempio, ipotizzando di voler positivizzare 120 μL di sangue ad una concentrazione di PSA pari a 7 ng/mL, sapendo che la *vial* standard utilizzata ha una concentrazione di 500 ng/mL, il valore di V_V risulta essere pari a circa 1.7 μL .

A.3.1 Simulazione dei campioni positivi nei test con pre-diluizione

Nel caso della pre-diluizione, come già spiegato all'interno dell'elaborato, il rapporto di diluizione fra campione di sangue e soluzione diluente è pari a 1:20. Tale condizione porterebbe ad un'eccessiva diluizione dell'antigene di interesse, rendendolo dunque difficile da individuare all'interno della miscela biologica. Per questo motivo, fissato un certo valore di concentrazione di antigene, è opportuno andare a determinare come questa condizione possa essere riprodotta nel caso di un test in pre-diluizione. In particolare, facendo riferimento al test per PSA, ipotizzando di voler analizzare un campione positivo con concentrazione pari a 7 ng/ml, sottoponendolo ad un trattamento mediante configurazione standard (30 µL di sangue e 60 µL di diluente), la concentrazione finale di antigene depositato sulla striscia risulterebbe pari a 2,34 ng/mL. Nel caso della pre-diluizione, il volume totale di soluzione sarebbe pari a 600 µL dal momento che all'interno del flacone sarebbero diluiti 30 µL di sangue in 570 µL di diluente prima di essere dispensati sulla membrana. Per questo motivo, per riprodurre la condizione di 2,34 ng/mL nella configurazione appena descritta, è necessario utilizzare un campione di sangue caratterizzato da una concentrazione 20 volte superiore all'ultima appena citata. Di conseguenza, il valore di C_T da raggiungere sul campione di sangue è pari a 46,8 ng/mL. Esattamente come nel caso precedente, è stata utilizzata la seguente formula per determinare il volume di soluzione necessaria a positivizzare il campione:

$$V_V = \frac{C_T \cdot V_S}{(C_V - C_T)}$$

Ipotizzando quindi di voler positivizzare 120 µL di sangue fino ad una concentrazione di 46,8 ng/mL e sapendo che la vial ha una concentrazione di PSA pari a 500 ng/mL, il valore di V_V risulta essere pari a 12,4 µL. Lo stesso calcolo è stato effettuato sia nel caso del test per IgE totali, sia nel caso degli esperimenti effettuati depositando sulla membrana reattiva 60 µL e 120 µL di soluzione totale, ovvero 30 µL di sangue accompagnati rispettivamente da 30 µL e 90 µL di diluente.