



Publication Year	2020
Acceptance in OA	2025-03-28T08:29:13Z
Title	DISPOSITIVO E METODO PER IL CAMPIONAMENTO E LA RILEVAZIONE DI UN AGENTE PATOGENO NELL'ARIA
Authors	ESPOSITO, Francesca, BRUCATO, John Robert, COZZOLINO, Fabio, MONGELLUZZO, Giuseppe, POPA, IONUT CIPRIAN, FORNARO, Teresa, MENEGHIN, Andrea, PAGLIALUNGA, DANIELE, PARESCI, Giovanni, DE CESARE, Giampiero, CAPUTO, Domenico, NASCETTI, Augusto, COSTANTINI, Francesca, LOVECCHIO, Nicola, IANNASCOLI, Lorenzo, MIRASOLI, Mara, MICHELINI, Elisa, GUARDIGLI, Massimo, CLERICI, Mario, TRABATTONI, Daria, BIASIN, Mara, SCACCABAROZZI, Diego
Handle	http://hdl.handle.net/20.500.12386/36968

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102020000018409
Data Deposito	29/07/2020
Data Pubblicazione	29/01/2022

Classifiche IPC

Titolo

DISPOSITIVO E METODO PER IL CAMPIONAMENTO E LA RILEVAZIONE DI UN AGENTE PATOGENO NELL'ARIA

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"DISPOSITIVO E METODO PER IL CAMPIONAMENTO E LA RILEVAZIONE
DI UN AGENTE PATOGENO NELL'ARIA"

di 1) 56% ISTITUTO NAZIONALE DI ASTROFISICA

di nazionalità italiana

con sede: VIALE DEL PARCO MELLINI 84

00136 ROMA (RM)

di 2) 25% UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

di nazionalità italiana

con sede: PIAZZALE ALDO MORO, 5

00185 ROMA (RM)

di 3) 10% ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

di nazionalità italiana

con sede: VIA ZAMBONI, 33

40126 BOLOGNA (BO)

di 4) 6% UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

di nazionalità italiana

con sede: VIA FESTA DEL PERDONO 7

20122 MILANO (MI)

di 5) 3% POLITECNICO DI MILANO

di nazionalità italiana

con sede: PIAZZA LEONARDO DA VINCI, 32

20133 MILANO (MI)

Inventori: ESPOSITO Francesca, BRUCATO John Robert,

COZZOLINO Fabio, MONGELLUZZO Giuseppe, POPA Ciprian Ionut,
FORNARO Teresa, MENECHIN Andrea, PAGLIALUNGA Daniele,
PARESCHI Giovanni, DE CESARE Giampiero, CAPUTO Domenico,
NASCETTI Augusto, COSTANTINI Francesca, LOVECCHIO Nicola,
IANNASCOLI Lorenzo, MIRASOLI Mara, MICHELINI Elisa,
GUARDIGLI Massimo, CLERICI Mario, TRABATTONI Daria, BIASIN
Mara, SCACCABAROZZI Diego

*** ***** ***

La presente invenzione è relativa ad un dispositivo e ad un metodo di campionamento e di rilevazione di agenti patogeni nell'aria. L'invenzione trova sue forme di applicazione preferite nel campionamento di aria principalmente in ambienti chiusi quali sale di attesa di pronto soccorso, stanze di ospedale, supermercati, uffici, ascensori, metropolitane, ecc., così come nelle emissioni di aerosol prodotte direttamente dalle vie aeree di un paziente e negli apparati di respirazione e aerazione, per il rilevamento di agenti patogeni nell'aria campionata. Più in particolare, il dispositivo della presente invenzione permette di rilevare virus sospesi nell'aria campionata dal dispositivo stesso, tra cui il virus SARS-CoV-2, a cui nel seguito si farà riferimento senza però perdere di generalità.

Nella situazione attuale di emergenza sanitaria provocata dalla diffusione globale e incontrollata del virus SARS-CoV-2, è necessario introdurre stringenti misure di

controllo e di prevenzione allo scopo di limitare la probabilità di contrarre la malattia.

Tra queste misure sono auspicabili metodi accurati e tempestivi per il campionamento e il rilevamento del virus SARS-CoV-2 nell'aria. Il ruolo fondamentale assunto dal rilevamento del virus SARS-CoV-2 nell'aria campionata, quale metodo che può efficacemente contribuire a contrastare il dilagare della pandemia, nasce da diversi studi scientifici che evidenziano la possibile sopravvivenza del virus SARS-CoV-2 nell'aria per diverse ore e per lunghe distanze.

A seguito di tale evidenza scientifica, l'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda di mantenere una distanza tra gli individui di circa 1 metro al fine di contenere la diffusione delle infezioni da virus SARS-CoV-2. Come riportato in un recente rapporto (L. Bourouiba, "Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions", JAMA Insight, 2020), tali raccomandazioni nascono da una stima delle distanze basate su modelli, sviluppati nella prima metà del 1900, che prevedono che il contagio possa avvenire attraverso goccioline espiratorie di dimensioni sufficientemente grandi da potersi depositare nelle immediate vicinanze degli individui infetti prima di evaporare. Le goccioline espiratorie più piccole sono soggette invece a evaporazione prima di riuscire a depositarsi. Tuttavia, il rapporto mostra che, in seguito ad

espirazione, starnuti e tosse, oltre alla goccioline che seguono traiettorie semi-balistiche, si genera una nube di gas turbolento che trasporta al suo interno uno sciame di goccioline in un continuum di dimensioni. L'ambiente umido e caldo della nube contribuisce ad allungare i tempi di evaporazione delle goccioline rispetto al caso isolato, allungando il loro tempo di vita fino ad un fattore 1000 e portando le distanze percorse a circa 7-8 m. Le goccioline che si depositano lungo la traiettoria possono contaminare le superfici, le altre rimangono intrappolate nella nube fino a quando questa non perde quantità di moto e permette l'evaporazione. Rimangono quindi residui o nuclei di goccioline che possono mantenersi in sospensione per ore nell'aria. La permanenza delle goccioline nell'aria è regolata dalle condizioni ambientali e dai sistemi di aerazione e condizionamento eventualmente attivi.

Tale evidenza scientifica è supportata da altri studi come ad esempio quello condotto da N. van Doremalen et al., "Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1", The New England Journal of Medicine, 2020, che riporta la persistenza del virus SARS-CoV-2 nell'aerosol per almeno 3 ore.

Oltre alle goccioline espiratorie, il SARS-CoV-2 è immesso nell'aria anche con il semplice respiro, come dimostra uno studio statunitense che ha rivelato il virus

SARS-CoV-2 in campioni d'aria raccolti a oltre 1,8 metri di distanza tra due pazienti, o nelle sale operatorie durante gli interventi su pazienti infetti.

Allo stesso tempo, il virus può sopravvivere per diverse ore in apparati di ventilazione e sistemi di aerazione. Ci sono inoltre evidenze della presenza di virus su varie superfici, dai pavimenti alle pareti delle stanze degli ospedali. Da tali superfici, il virus potrebbe essere riportato nell'aria ad esempio camminando su pavimenti contaminati.

Oltre alle goccioline espirate e al semplice respiro dei soggetti infetti, un ulteriore veicolo di trasmissione del virus è costituito potenzialmente dal particolato atmosferico. Diversi studi mostrano infatti il possibile legame tra l'inquinamento da particolato atmosferico e la diffusione dell'epidemia da SARS-CoV-2, mentre un altro studio annuncia il ritrovamento del virus sul particolato.

Da qui l'esigenza di campionare ed analizzare sia il particolato atmosferico sia l'aerosol, includendo anche il l'aerosol emesso direttamente da soggetti potenzialmente affetti da SARS-CoV-2.

A seguito dell'identificazione del virus, si possono quindi attuare azioni mirate e tempestive volte, per esempio, alla sanificazione dell'ambiente in cui si è effettuata la campionatura dell'aria ma anche dei locali limitrofi,

all'individuazioni dei soggetti, quali assidui frequentatori di tale ambiente, e quindi sottoporli ai test diagnostici, e ad accertare direttamente la diagnosi di infezione da virus nel caso in cui l'aria prelevata provenga direttamente dal respiro di un paziente o di soggetti asintomatici, fornendo al dispositivo della presente invenzione una funzionalità diagnostica non soltanto di tipo ambientale ma anche ad uso medico affiancando i comuni tamponi rino-faringei.

Nella letteratura brevettuale e non, sono noti dispositivi che attuano distintamente il campionamento dell'aria con cattura degli agenti patogeni in essa contenuti e il rilevamento di detti agenti patogeni sulla base di analisi chimiche o biomolecolari o di proprietà chimico-fisiche.

Tra i dispositivi appartenenti alla prima categoria e quindi più comunemente utilizzati per campionare l'aria e catturare i virus, emergono gli impattori solidi (tra cui impattori di Andesen o a fenditura) o liquidi (All-glass impingers - AGIs e simili), campionatori ciclonici e filtri.

Per quanto riguarda invece i metodi di rilevamento di agenti patogeni, tra cui i virus, accanto alle tradizionali tecniche spettroscopiche e di tipo microbiologico, si affiancano i più recenti dispositivi che si avvalgono della tecnologia lab-on-chip. A tal proposito, il brevetto WO2008/090578 descrive un sistema integrato per analisi di

tipo chimico e/o biomolecolare che sfrutta la tecnologia lab-on-chip per eseguire, in modo automatico e rapido, analisi complesse su piccole quantità di DNA. Il campione di DNA amplificato per effetto della reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction - PCR), viene analizzato per mezzo di tecniche spettroscopiche in emissione o in assorbimento, la cui risposta viene tradotta in un impulso elettrico grazie ai sensori optoelettronici integrati nel chip.

Tuttavia, i dispositivi noti sopra citati, come altri simili, presentano alcune limitazioni. In primo luogo, la campionatura e il rilevamento di agenti patogeni sono realizzati in fasi distinte e con dispositivi indipendenti. È pertanto necessario l'intervento di un operatore che possa prelevare il campione raccolto in un primo dispositivo e, successivamente, predisporre il campione all'analisi per mezzo di un secondo dispositivo. Solitamente, il campione raccolto deve essere trattato prima di essere analizzato. Per esempio, dal campione di aria raccolto viene isolato il materiale biologico da cui si estraggono gli acidi nucleici (RNA e DNA), quali macromolecole da sottoporre a diagnostica molecolare per l'individuazione di agenti infettivi. Anche per attuare tali fasi di trattamento del campione raccolto vengono utilizzati dispositivi specifici. Pertanto, l'intervento di un operatore così come l'impiego di

molteplici dispositivi specifici e spesso non compatibili, implica problemi di tipo logistico, per il trasferimento di campioni dal dispositivo di campionamento al dispositivo di analisi previa fase di trattamento, criticità connesse all'affidabilità, qualità e riproducibilità dei risultati con annesso dispendio economico e di tempo. In secondo luogo, solitamente i dispositivi per il rilevamento, così come quelli impiegati nella fase di trattamento del campione, sono caratterizzati da apparati strumentali sofisticati e spesso ingombranti installati in laboratori specializzati.

Di conseguenza, l'analisi dell'aria campionata non avviene on-site bensì in luoghi e tempi diversi rispetto alla campionatura, introducendo complessi e delicati meccanismi di stoccaggio e conservazione del campione e allungando le tempistiche per accertare la presenza di eventuali agenti patogeni contenuti nell'aria campionata.

È pertanto uno scopo della presente invenzione quello di realizzare un dispositivo in grado di integrare molteplici tecnologie che sia privo degli inconvenienti dei dispositivi noti e sopra specificati. In particolare, scopo della presente invenzione è quello di realizzare un dispositivo integrato e facilmente trasportabile in grado di effettuare il campionamento dell'aria, il trattamento del campione raccolto e il rilevamento di agenti patogeni contenuti nell'aria campionata.

In accordo con tale scopo, la presente invenzione è relativa a un dispositivo secondo la rivendicazione 1.

La presente invenzione è inoltre relativa a un metodo secondo la rivendicazione 20.

Tale invenzione permette quindi di campionare e analizzare l'aria, contenente aerosol e/o particolato atmosferico, impiegando un unico dispositivo compatto, portatile e semi-automatico che combina le funzionalità di tre moduli. Pertanto, detto dispositivo consente di campionare l'aria e di analizzarla direttamente on-site riducendo i tempi e costi connessi al trasporto del campione dal luogo di prelievo ai laboratori specializzati per l'analisi. Precisamente, detto dispositivo permette di rilevare agenti patogeni contenuti nell'aria campionata, preferibilmente consente di rilevare il virus SARS-CoV-2. Pertanto, il rilevamento del virus risulta tempestivo e semplificato, ed il dispositivo può essere azionato anche da operatori non specializzati pur mantenendo un elevato livello di accuratezza dei risultati ottenuti.

Per una migliore comprensione della presente invenzione vengono descritte nel seguito alcune forme di attuazione preferite con riferimento ai disegni allegati, nei quali:

la figura 1 è uno schema a blocchi del dispositivo secondo la presente invenzione;

la figura 2 è uno schema di un primo modulo del

dispositivo di figura 1;

la figura 3 è una vista prospettica schematica del dispositivo secondo la presente invenzione, con una vista prospettica, schematica ed esplosa dei componenti di un secondo modulo del dispositivo;

la figura 4 è un diagramma di flusso in cui sono illustrate le varie fasi di trattamento del campione che avvengono nel secondo modulo; e

la figura 5 è una vista prospettica schematica di un terzo modulo del dispositivo.

Con riferimento alla figura 1, è indicato con 1 nel suo complesso un dispositivo per il campionamento e la rivelazione di agenti patogeni nell'aria secondo la presente invenzione.

Il dispositivo 1 comprende in cascata un primo modulo A per il campionamento dell'aria, un secondo modulo B per l'isolamento ed trattamento di materiale biologico contenuto nell'aria campionata ed un terzo modulo C per l'analisi di tale materiale.

In figura 2 è illustrato schematicamente un esempio di attuazione del primo modulo A facente parte di un dispositivo 1.

Il primo modulo A è in grado di campionare particelle e/o goccioline le cui dimensioni sono comprese tra 100 nm e 40 μ m. Tale intervallo dimensionale include sia il

particolato atmosferico con diametri inferiori a 10 μm (PM10 e PM2.5), sia le goccioline contenute nell'aerosol emesso durante la respirazione o attraverso tosse e starnuti, con dimensioni variabili comprese tra meno di 1 μm e circa 16 μm .

Il primo modulo A comprende un involucro 2 provvisto di un'apertura di ingresso 3, un condotto di ingresso 4 comunicante con l'apertura 3, un condotto di uscita 5 ed una pompa 6 disposta lungo il condotto di uscita 5 per determinare un flusso d'aria attraverso il condotto di ingresso 4. All'interno dell'involucro 2 ed in posizione affacciata al condotto di ingresso 4 è disposto un collettore 7 atto ad intercettare le particelle 8 trascinate dal flusso d'aria aspirato.

Il collettore 7 può assumere diverse forme di attuazione a seconda della natura delle particelle che si vogliono campionare. Ad esempio, nel caso in cui l'interesse prevalente sia l'analisi delle goccioline di un aerosol, come nel caso dell'analisi dell'aria espirata da un paziente o circolante in un impianto di ventilazione, il collettore 7 comprende un telaio 10 di supporto ed una membrana 11 di cellulosa umidificata, ad esempio ovatta di cotone compressa impregnata di una quantità di acqua compresa tra 2 ml e 4 ml, che occupa una porzione centrale del telaio 10.

La membrana 11 del collettore 7 può essere composta da altri materiali oltre alla cellulosa a condizione che

l'aerosol adsorbito venga mantenuto in soluzione acquosa.

Il telaio 10 è convenientemente metallico ed è regolato termicamente attraverso una cella Peltier 13 in maniera da consentire la condensazione dell'aerosol sulla membrana 11 ed evitare la ri-evaporazione delle goccioline di aerosol 8.

La miscela di goccioline 8 di aerosol intercettate dalla membrana 11 e acqua presente nella membrana 11 stessa rappresenta una soluzione biologica 15 da sottoporre a diagnostica molecolare.

Le goccioline 8 ed eventuali altre sostanze non intrappolate nel collettore 7 raggiungono il condotto di uscita 5 e vengono reimmesse nell'ambiente esterno.

Il rapporto tra la dimensione di un foro di uscita 19 del condotto di ingresso 4 rispetto alla dimensione del collettore 7 deve essere calibrato in modo da assicurare l'impatto delle goccioline 8 sul collettore 7. Inoltre, le geometrie in termini di lunghezza e diametro del condotto di ingresso 4 e di uscita 5 influenzano rispettivamente l'efficienza di campionamento e la portata (volume aspirato nel tempo) del primo modulo A.

Un'implementazione del primo modulo A, illustrato in figura 2, a titolo esemplificativo prevede:

- un condotto di ingresso 4 inizialmente cilindrico con un diametro interno di 4 mm e poi conico con un diametro interno del foro di uscita 19 di 1 mm;

- un collettore 7 di forma cilindrica e di diametro pari a 16 mm nel suo complesso, con la membrana 11 di cellulosa di 10 mm di diametro al centro;
- una distanza ravvicinata tra il foro di uscita 19 del condotto di ingresso 4 e il collettore 7 pari a 4 mm;
- un condotto di uscita 5 avente forma cilindrica, con diametro interno di 4 mm;
- una pompa di aspirazione 6 in grado di generare una portata di 2 l/m.

I suddetti valori possono essere modificati attraverso simulazioni di fluidodinamica purché l'intervallo dimensionale di campionamento delle goccioline 8 rimanga invariato e compreso tra 100 nm e 40 μ m.

La soluzione biologica 15, di volume compreso nell'intervallo tra 50 μ l e 1000 μ l, viene aspirata e trasferita verso il secondo modulo B.

Allo scopo, il modulo B, descritto in dettaglio nel seguito, comprende in ingresso una camera di interconnessione 18 collegata alla membrana 11 mediante un sistema di interconnessione comprendente uno o più microtubi 17; in figura 2 e 3 è illustrato per semplificazione grafica solo un microtubo 17.

Il microtubo 17 comprende una estremità collegata all'interno del collettore 7, direttamente o tramite un ago inserito nella membrana 11, ed un'estremità opposta collegata

alla camera di interconnessione 18 nel secondo modulo B.

Il sistema di interconnessione comprende una pompa peristaltica 16 miniaturizzata che permette la suzione della soluzione biologica 15 dalla membrana 11 nel primo modulo A alla camera di interconnessione 18 nel secondo modulo B (figura 3).

Secondo una variante di realizzazione dell'invenzione, il collettore 7 può essere collegato ad un sistema di umidificazione, nel caso in cui la componente acquosa già presente nella membrana 11 non sia quantitativamente sufficiente, ad esempio nel caso in cui il protocollo di campionamento preveda una fase di campionamento relativamente lunga, a fronte della quale potrebbe verificarsi un'essiccazione della membrana 11.

Il sistema di umidificazione può comprendere, ad esempio, un serbatoio contenente una riserva di acqua distillata ed una pompa peristaltica (non mostrati in figura 2) collegata al collettore 7 tramite un microtubo 26.

Secondo un'altra forma di attuazione preferita dell'invenzione, il primo modulo A è configurato per il campionamento del particolato atmosferico. Tale configurazione prevede la sostituzione della membrana 11 del collettore 7, utilizzata per intrappolare le goccioline 8 di aerosol, con una vaschetta protetta da un filtro dimensionato in modo da trattenere le particelle di dimensioni superiori

a quelle di interesse. La vaschetta è collegata ad un sistema di umidificazione come sopra descritto.

Pertanto, il particolato che passa attraverso il filtro viene raccolto dall'acqua contenuta nella vaschetta, da cui può essere prelevato tramite un microtubo eventualmente provvisto di ago come precedentemente descritto.

Analogamente alla raccolta delle goccioline 8 di aerosol, una soluzione biologica, ottenuta dalla miscelazione del particolato intrappolato nella vaschetta con la soluzione acquosa, viene aspirata nel secondo modulo B grazie al sistema di interconnessione sopra descritto.

In figura 3 è illustrato nel suo complesso il secondo modulo B, il quale comprende una serie di camere miniaturizzate in cui si svolgono specifiche fasi dell'attività di isolamento e trattamento del materiale biologico a partire dalla soluzione biologica 15, ed in particolare le fasi per:

- filtrare la soluzione biologica 15 proveniente dal primo modulo A;
- isolare e concentrare l'RNA virale per mezzo di reagenti di lisi e bead magnetiche;
- estrarre l'RNA virale in un piccolo volume (5-50 µl) di soluzione eluente che viene inviata al terzo modulo C.

In particolare il secondo modulo B comprende una camera di filtrazione 21 suddivisa in una subcamera 21a collegata

alla camera di interconnessione 18 ed una subcamera 21b separata dalla subcamera 21a da una parete trasversale comprendente un filtro 22 configurato per trattenere particelle di dimensioni maggiori o uguali a 0.5 μm .

Il secondo modulo B comprende inoltre una camera di reazione 28 in cui all'isolamento del virus disperso nella soluzione filtrata 24, segue un processo di rilascio dell'RNA virale.

L'aspirazione della soluzione biologica 15 dalla camera di interconnessione 18 alla camera di reazione 28 è realizzata da una pompa peristaltica 23 collocata a valle della subcamera 21b. Pertanto, la subcamera 21b rappresenta la sede di raccolta di una soluzione biologica filtrata 24.

Le particelle solide trattenute dal filtro 22 possono essere rimosse mediante un sistema di aspirazione non illustrato.

La camera di reazione 28 è selettivamente collegata ad un serbatoio 30 contenente reagenti di lisi e binding tramite una pompa 29, e ad un serbatoio 33 contenente bead magnetiche sospese in acqua tramite una pompa 32. I suddetti reagenti e la sospensione di bead, così come altre sostanze descritte nel seguito, sono disponibili in kit sotto la denominazione commerciale Dynabeads® SILANE Viral NA prodotto dalla ThermoFisher.

Nella camera di reazione 28 è disposto un dispositivo

di agitazione magnetica 34 atto a generare, quando eccitato, un campo magnetico oscillante avente lo scopo di agitare la miscela di reazione contenuta nella camera di reazione 28.

Il secondo modulo B comprende infine una camera di estrazione 38 dell'RNA collegata alla camera di reazione 28 e alloggiante una bobina 39 (o magneti permanenti) configurata per definire un percorso magnetico di estrazione per il trasporto delle bead a cui è legato l'RNA virale. Alla camera di estrazione 38 sono collegati selettivamente un serbatoio 42 contenente una soluzione tampone di lavaggio ed un serbatoio 45 contenente un reagente di eluizione tramite rispettive pompe 41, 44 (tali prodotti fanno parte del kit sopra menzionato). Un'ulteriore pompa 48 è atta alla rimozione del surnatante e della soluzione tampone di lavaggio dalla camera di estrazione 38 verso un serbatoio 49 di scarico.

Il secondo modulo B comprende infine una camera di interconnessione 50 atta a ricevere una soluzione di RNA dalla camera di estrazione 38 mediante una pompa 51, nonché reagenti per uso nel successivo modulo C, come verrà meglio descritto nel seguito.

Il funzionamento del secondo modulo B, già in parte evidente da quanto precede, è descritto nel seguito con riferimento alla figura 4, in cui sono illustrate le varie fasi con riferimento alle camere del secondo modulo B nelle

quali avvengono.

La soluzione biologica 15, uscente dal primo modulo A, viene aspirato dalla pompa 16 e raccolto nella camera di interconnessione 18 (blocco 100). Il campione viene quindi trasportato nella camera di filtrazione 21 nella quale avviene una fase di filtrazione (blocco 101) in cui vengono rimosse le particelle solide presenti nell'aria e raccolte dal primo modulo A. La soluzione filtrata 24 viene quindi inviata nella camera di reazione 28 in cui avvengono in successione le fasi di immissione delle bead magnetiche (blocco 102), di immissione dei reagenti per la lisi e il binding (blocco 103), e di reazione di lisi della capsida virale e di binding delle bead con l'RNA virale rilasciato (blocco 104).

Al termine delle reazioni, il campione viene inviato attraverso il percorso magnetico 39 nella camera di estrazione dell'RNA 38 dove viene lavato mediante la soluzione tampone (blocco 105) immessa tramite la pompa 41. Successivamente il reagente per l'eluizione viene introdotto nella camera di estrazione dell'RNA 38 (blocco 106) mediante la pompa 44, avviando così la fase di eluizione (blocco 107). Una volta terminata la fase di eluizione che richiede qualche minuto, il surnatante viene eliminato (blocco 108) tramite la pompa 48 mentre il campione di RNA estratto 52 viene inviato verso la camera di interconnessione 50 tramite una

pompa 51.

Convenientemente, alla camera di interconnessione 50 è collegato un serbatoio 55 contenente una miscela di reagenti per l'amplificazione dell'RNA come descritto nel seguito tramite una pompa 56 (blocco 109). Una miscela reattiva, quale prodotto dell'interazione tra la soluzione di RNA 52 e dei reagenti per l'amplificazione, viene inviata al modulo C (blocco 110).

Le camere in cui avvengono le varie fasi possono essere opportunamente termostatate.

La camera di interconnessione 50 è collegata al terzo modulo C mediante un sistema di interconnessione comprendente una pompa 57 e un microtubo 53 (figura 3).

Il terzo modulo C è illustrato schematicamente in figura 5 e comprende un dispositivo lab-on-chip 66 per l'amplificazione e il rilevamento dell'RNA virale in tempo reale ed un'unità elettronica 60 di lettura, controllo, e interfaccia per l'acquisizione e l'elaborazione di segnali dal dispositivo lab-on-chip 66.

Il dispositivo lab-on-chip 66 comprende un unico substrato monolitico o più substrati accoppiati in modo permanente o provvisorio, al cui interno sono integrati:

- uno o più sensori ottici 69 (fotodiodi oppure fototransistori oppure dispositivi multi-giunzione) a film sottile in silicio amorfo idrogenato (a-Si:H);

- uno o più sensori di temperatura 70 (singoli strati di materiale intrinseco o drogato oppure diodi oppure dispositivi multi-giunzione) a film sottile in a-Si:H;
- uno o più riscaldatori 71 resistivi realizzati tramite film metallici oppure ossidi conduttivi trasparenti (per esempio ossido di indio e stagno) oppure una combinazione dei due;
- un'unità microfluidica 73 per il contenimento e il trattamento dei campioni durante la fase analitica; e
- uno o più punti di accesso alla rete microfluidica 73 per l'immissione di campioni e reagenti ed eventualmente per la loro rimozione.

In particolare, l'unità microfluidica 73 può essere costituita da una rete di microtubi usa e getta a basso costo oppure permanenti e riutilizzabili previa implementazione di opportune procedure di pulizia e/o sterilizzazione.

Nell'esempio illustrato, l'unità microfluidica 73 comprende una rete microfluidica 77 costituita da un semplice canale microfluidico collegato in ingresso al microtubo 53, dal quale riceve il campione da trattare insieme con i reagenti aggiuntivi ed in uscita ad un microtubo 74 collegabile ad un serbatoio di scarto non illustrato.

In alternativa, la rete microfluidica 77 può essere più complessa e comprendente diversi microcanali e microserbatoi, ad esempio costituiti da pozzetti di volume opportuno.

Il rilevamento dell'amplificazione dell'RNA virale può avvenire in fluorescenza o in chemiluminescenza o in bioluminescenza. Nell'esempio illustrato il rilevamento avviene in fluorescenza, ed il terzo modulo (C) comprende anche una sorgente di radiazione di eccitazione 64.

I materiali utilizzati per il dispositivo lab-on-chip 66 comprendono, e non si limitano a, uno o più tra i seguenti materiali: vetro, resine polimeriche, polidimetilsilossano (PDMS), copolimeri olefinici ciclici (COC), adesivi sensibili alla pressione (PSA), silicio.

Nell'esempio illustrato, l'unità microfluidica 73 è realizzata in COC con microfresature sigillate mediante nastro adesivo sensibile alla pressione.

Una volta caricata la soluzione di RNA 52 ed i reagenti all'interno del canale microfluidico 77, può iniziare la fase analitica di amplificazione dell'RNA virale attraverso l'implementazione di tecniche note quali PCR, LAMP, LAMP-BART, RT-PCR, RT-LAMP e altre.

Nell'esempio illustrato, i sensori on-chip 69, 70 ed il riscaldatore on-chip 71 sono convenientemente ricavati su facce opposte di una lastra di vetro 75 a costituire un sistema su vetro (SoG, System on Glass) accoppiato all'unità microfluidica 73, ad esempio come descritto nell'articolo scientifico B.B. Bruijns et al., "On-chip real-time monitoring of multiple displacement amplification of DNA",

Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier B.V., 2019.

L'unità elettronica 60 è strutturata su più livelli. Un primo livello è rappresentato da una scheda di ingresso/uscita 61, al di sotto della quale è collocata una scheda di controllo 62. L'ultimo livello è costituito da una scheda di interfaccia 63 che mette in collegamento il dispositivo lab-on-chip 66 con sistemi di interfaccia utente (segnalatori luminosi, display, computer di interfaccia). Il dispositivo lab-on-chip 66 è collegato alla scheda di ingresso/uscita 61 dell'unità elettronica 60 attraverso una serie di contatti elettrici 67 che emergono dalla scheda di ingresso/uscita 61.

I contatti elettrici 67 conducono i seguenti segnali o tensioni:

- Tensione di polarizzazione dei sensori ottici 69 generata dalla scheda di ingresso/uscita 61;
- Corrente generata dai sensori ottici 69 che viene misurata dalla scheda di ingresso/uscita 61;
- Corrente di polarizzazione dei sensori di temperatura 70 generata dalla scheda di ingresso/uscita 61;
- Caduta di tensione sui sensori di temperatura 70 che viene misurata dalla scheda di ingresso/uscita 61;
- Corrente di attuazione del riscaldatore 71 fornita

dalla scheda di ingresso/uscita 61 sulla base di un algoritmo di controllo in funzione della temperatura misurata.

La scheda di ingresso/uscita 61 contiene tra l'altro amplificatori di transimpedenza a basso rumore, convertitori analogico-digitale a basso rumore, generatori di tensione di polarizzazione compresa tra 0 e 5 V a basso rumore, generatori di corrente di polarizzazione compresa tra 1 nA e 0.1 mA a basso rumore, generatori di corrente compresa tra 10 mA e 1 A ad alta efficienza.

La scheda di controllo 62 contiene un microcontrollore o DSP o microprocessore con circuiteria esterna di interfaccia per la gestione del protocollo da implementare sul dispositivo lab-on-chip 66 attraverso la scheda di ingresso/uscita 61, e la gestione dei sistemi ancillari presenti nel dispositivo 1, ad esempio le pompe microfluidiche del secondo modulo B.

La scheda di interfaccia 63 contiene l'elettronica per la gestione dell'interfaccia verso l'utente (display, sistemi di segnalazione ottica o acustica, interfaccia dati verso un calcolatore esterno, ecc.).

Le schede 61, 62 e 63 oppure un loro sottoinsieme possono essere implementate su un'unica scheda. Oppure, le singole schede possono essere realizzate attraverso la combinazione di più moduli.

Una sorgente di radiazioni 64, compresa nel terzo modulo C, illumina il dispositivo lab-on-chip 66 contenente il campione nel canale microfluidico 77 e i sensori ottici 69. In particolare, il campione da rilevare comprende sostanze fluorescenti (ad esempio fluorofori) che emettono luce in fluorescenza a seguito di eccitazione per assorbimento di radiazioni aventi specifiche lunghezze d'onda provenienti dalla sorgente di radiazioni 64. Preferibilmente, la sorgente di radiazione 64 emette radiazioni UV in risonanza con le sostanze fluorescenti comprese nel campione. La sorgente di radiazioni 64 può essere costituita da LED.

Convenientemente, i sensori ottici 69 sono provvisti di filtri interferenziali che assorbono le radiazioni provenienti dalla sorgente di radiazioni 64 e trasmettono le radiazione emesse in fluorescenza dal campione

Ulteriori dettagli tecnici possono essere trovati nell'articolo citato e nel relativo Materiale Supplementare.

Il metodo di analisi implementato nel terzo modulo C, in cui l'amplificazione dell'RNA virale avviene tramite Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), a titolo esemplificativo prevede le seguenti fasi:

- preparazione della seguente miscela reattiva (nella camera di interconnessione 50):

- 0.5 μ l di Primer mix
- 0.2 μ l di Reverse transcriptase enzyme,

- 5 μ l di Master mix (contiene oligonucleotidi DNA-polimerasi e $MgCl_2$),
 - 1.33 μ L di fluoroforo (Sybr Green/ $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ con concentrazione 10^{-5} M),
 - 3 μ L di soluzione di RNA di virus SARS-COV-2,
- (i reagenti sopra elencati sono disponibili commercialmente e acquistabili, ad esempio, presso Promeda Corporation);
- il caricamento della miscela reattiva nel canale microfluidico 77;
 - l'inizio della procedura analitica implementata attraverso il dispositivo lab-on-chip 66 e l'unità elettronica 60 connessa al dispositivo lab-on-chip 66 tramite i contatti elettrici 67. Nello specifico esempio con i reagenti indicati la procedura prevede:
 - uno step a 45°C per 45 minuti;
 - uno step a 95°C per 2 minuti;
 - 40 cicli termici:
 - 95°C per 15 secondi;
 - 60°C per 60 secondi.
 - il controllo termico è effettuato attraverso l'utilizzo dei sensori di temperatura 70 e il riscaldatore 71 ed eventualmente un sistema esterno di raffreddamento (per esempio una ventola non mostrata in figura 5).
 - l'accensione costante oppure ad intervalli della sorgente

di radiazioni 64, durante tutto il processo, e il segnale riemesso dal fluoroforo viene costantemente monitorato attraverso i sensori ottici 69.

- la determinazione della presenza ed eventualmente la quantificazione dell'RNA virale nel campione viene effettuata rilevando la variazione della fotocorrente generata dai sensori ottici 69.

In sostanza, un campione costituito da un piccolo volume di RNA virale purificato entra nell'unità di microfluidica 73 per mezzo del microtubo di ingresso 53, insieme con i relativi reagenti. Il prelevamento del campione dalla camera di interconnessione 50 al terzo modulo C è gestito dal sistema elettronico che pilota i componenti attivi del dispositivo lab-on-chip 66 e dei sistemi ancillari off-chip presenti nel dispositivo 1, ed in particolare nel secondo modulo B (pompe microfluidiche, ventole, ecc.). L'RNA virale, depositato sul lab-on-chip 66, viene amplificato tramite Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) oppure tramite Reverse Transcription Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP, RT-LAMP-BART).

Una volta ottenuta un'amplificazione di RNA virale sufficiente per la diagnostica molecolare, la fase di rilevamento può essere avviata. Nell'esempio illustrato la rilevazione dell'RNA di virus SARS-COV-2 avviene in fluorescenza. Infatti, all'RNA virale moltiplicato viene

aggiunto un fluoroforo che, manifesta un'intensa fotoluminescenza solo quando si lega all'RNA di virus SARS-COV-2. In alternativa, la rilevazione può avvenire in chemiluminescenza o bioluminescenza.

Dato che il rilevamento si basa su tecniche spettroscopiche in emissione, per aumentarne la sensibilità è necessario ridurre le radiazioni interferenti provenienti da sorgenti esterne al dispositivo lab-on-chip 66. Pertanto, il terzo modulo C è preferibilmente protetto da un involucro opaco ermetico che blocca le radiazioni interferenti.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo (1) per il campionamento e la rivelazione di un agente patogeno nell'aria comprendente:

- un primo modulo (A) di campionamento dell'aria configurato per raccogliere un campione di particelle contenute nell'aria;
- un secondo modulo (B) di trattamento del campione comprendente mezzi di estrazione di un acido nucleico dal campione;
- un terzo modulo (C) comprendente mezzi di analisi dell'acido nucleico per il rilevamento di agenti patogeni;
- primi mezzi di interconnessione configurati per trasferire il campione dal primo modulo (A) al secondo modulo (B);
- secondi mezzi di interconnessione configurati per trasferire l'acido nucleico del campione dal secondo modulo (B) al terzo modulo (C); e
- almeno un'unità di controllo automatico dei detti moduli e dei detti mezzi di interconnessione.

2. Dispositivo secondo la rivendicazione 1, in cui il primo modulo (A) comprende mezzi di aspirazione per aspirare un flusso d'aria da un ambiente esterno e un collettore (7) configurato per intercettare il flusso d'aria e trattenere dette particelle.

3. Dispositivo secondo la rivendicazione 2, in cui il collettore (7) comprende una membrana (11) umidificata.

4. Dispositivo secondo la rivendicazione 3, in cui la membrana (11) umidificata è di cellulosa.

5. Dispositivo secondo la rivendicazione 2, in cui il collettore (7) comprende una vaschetta protetta da un filtro.

6. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui i mezzi di aspirazione comprendono un condotto di ingresso (4) configurato per convogliare verso il collettore (7) particelle di dimensioni comprese tra 100 nm e 40 μ m.

7. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui i primi mezzi di interconnessione comprendono una camera di interconnessione (18) ed una pompa (16) collegata al collettore (7) tramite almeno un microtubo (17) per aspirare una soluzione acquosa contenente dette particelle dal collettore (7) alla camera di interconnessione (18).

8. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui il secondo modulo (B) comprende una camera di filtrazione (21) provvista di un filtro (22) configurato per trattenere particelle solide di dimensioni maggiori delle dimensioni dell'agente patogeno.

9. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui il secondo modulo (B) comprende una camera

di reazione (28) e mezzi di alimentazione nella camera di reazione (28) di bead magnetiche e di almeno un reagente di lisi e binding.

10. Dispositivo secondo la rivendicazione 9, in cui la camera di reazione (28) è provvista di mezzi di agitazione.

11. Dispositivo secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui il secondo modulo (B) comprende una camera di estrazione (38) dell'acido nucleico definente un percorso di avanzamento magnetico (39) delle bead magnetiche legate all'acido nucleico.

12. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui i mezzi di interconnessione comprendono rispettivi serbatoi e relative pompe per il trasferimento di una soluzione contenente il campione dal primo modulo (A) al secondo modulo (B) e per il trasferimento di una soluzione contenente almeno l'acido nucleico del campione dal secondo modulo (B) al terzo modulo (C).

13. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui i mezzi di analisi del terzo modulo (C) comprendono un dispositivo lab-on-chip (66) e un'unità elettronica (60).

14. Dispositivo secondo la rivendicazione 13, in cui il dispositivo lab-on-chip (66) comprende

- almeno un sensore ottico (69) a film sottile in silicio amorfo idrogenato (a-Si:H);

- almeno un sensore di temperatura (70) a film sottile in a-Si:H; e

- almeno un riscaldatore (71) resistivo realizzati tramite film metallici, ossidi conduttivi trasparenti o loro combinazioni.

15. Dispositivo secondo la rivendicazione 13 o 14, comprendente un'unità microfluidica (73) accoppiata al dispositivo lab-on-chip (66) e collegata ai secondi mezzi di interconnessione.

16. Dispositivo secondo la rivendicazione 15, in cui l'unità microfluidica (73) comprende almeno una sede (77) di contenimento dell'acido nucleico del campione e di reagenti per l'amplificazione dell'acido nucleico.

17. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni da 13 a 16, in cui l'unità elettronica (60) comprende mezzi di ingresso/uscita (61) per il collegamento con il dispositivo lab-on-chip (66), mezzi di controllo (62) per il controllo almeno del dispositivo lab-on-chip (66) e mezzi di interfaccia (63) per il collegamento con almeno un dispositivo di interfaccia utente.

18. Dispositivo secondo la rivendicazione 17, in cui i mezzi di controllo (62) controllano almeno un dispositivo del secondo modulo (B).

19. Dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui il terzo modulo (C) comprende una sorgente

di radiazioni di eccitazione (64) per il rilevamento dell'amplificazione in fluorescenza.

20. Metodo per il campionamento e la rivelazione di un agente patogeno nell'aria comprendente:

- un prima fase di campionamento dell'aria per raccogliere un campione di particelle contenute nell'aria;
- una seconda fase di trattamento del campione per l'estrazione di un acido nucleico dal campione;
- un terza fase di analisi dell'acido nucleico per il rilevamento di agenti patogeni;

dette fasi essendo eseguite in sequenza all'interno di un dispositivo integrato a controllo automatico.

21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui la seconda fase comprende le operazioni di:

filtrazione tramite un filtro (22) configurato per trattenere particelle solide di dimensioni maggiori delle dimensioni dell'agente patogeno;

lisi e binding dell'acido nucleico con bead magnetiche;
e

estrazione dell'acido nucleico.

22. Metodo secondo le rivendicazioni 20 o 21, in cui la terza fase comprende le operazioni di amplificazione dell'acido nucleico del campione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) e di rilevamento per fluorescenza o

chemiluminescenza o bioluminescenza dell'agente patogeno il cui acido nucleico viene amplificato.

23. Metodo secondo la rivendicazioni 22, in cui l'operazione di amplificazione dell'acido nucleico del campione è attivata dalla reazione tra l'acido nucleico del campione e reagenti specifici per detto acido nucleico.

24. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 23, in cui l'acido nucleico del campione è RNA.

25. Metodo secondo le rivendicazioni 23 o 24, in cui reagenti specifici amplificano l'RNA del virus SARS-CoV-2 tramite Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .

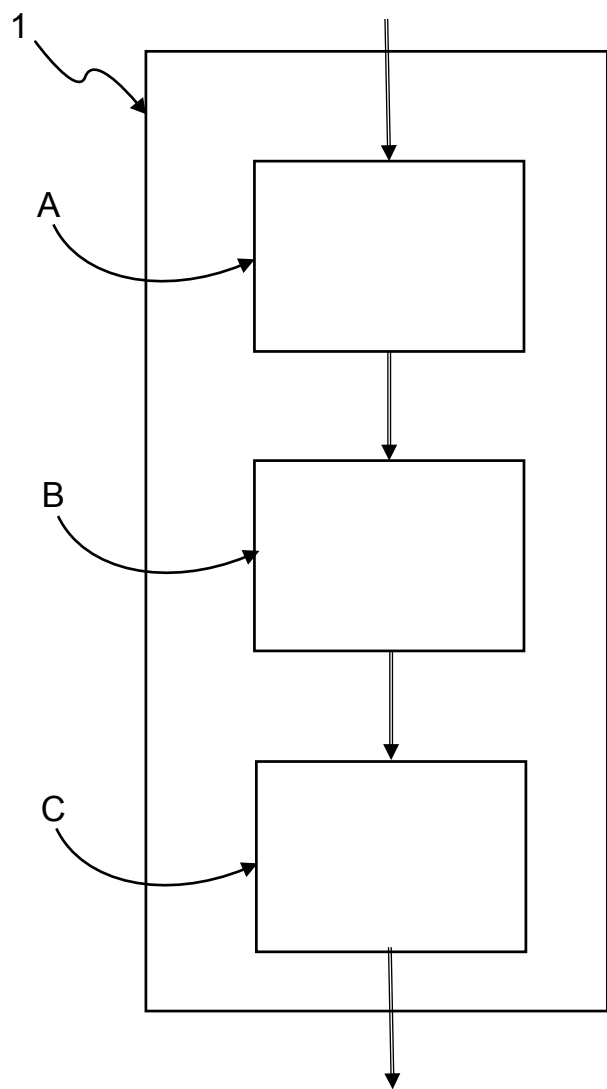


FIG. 1

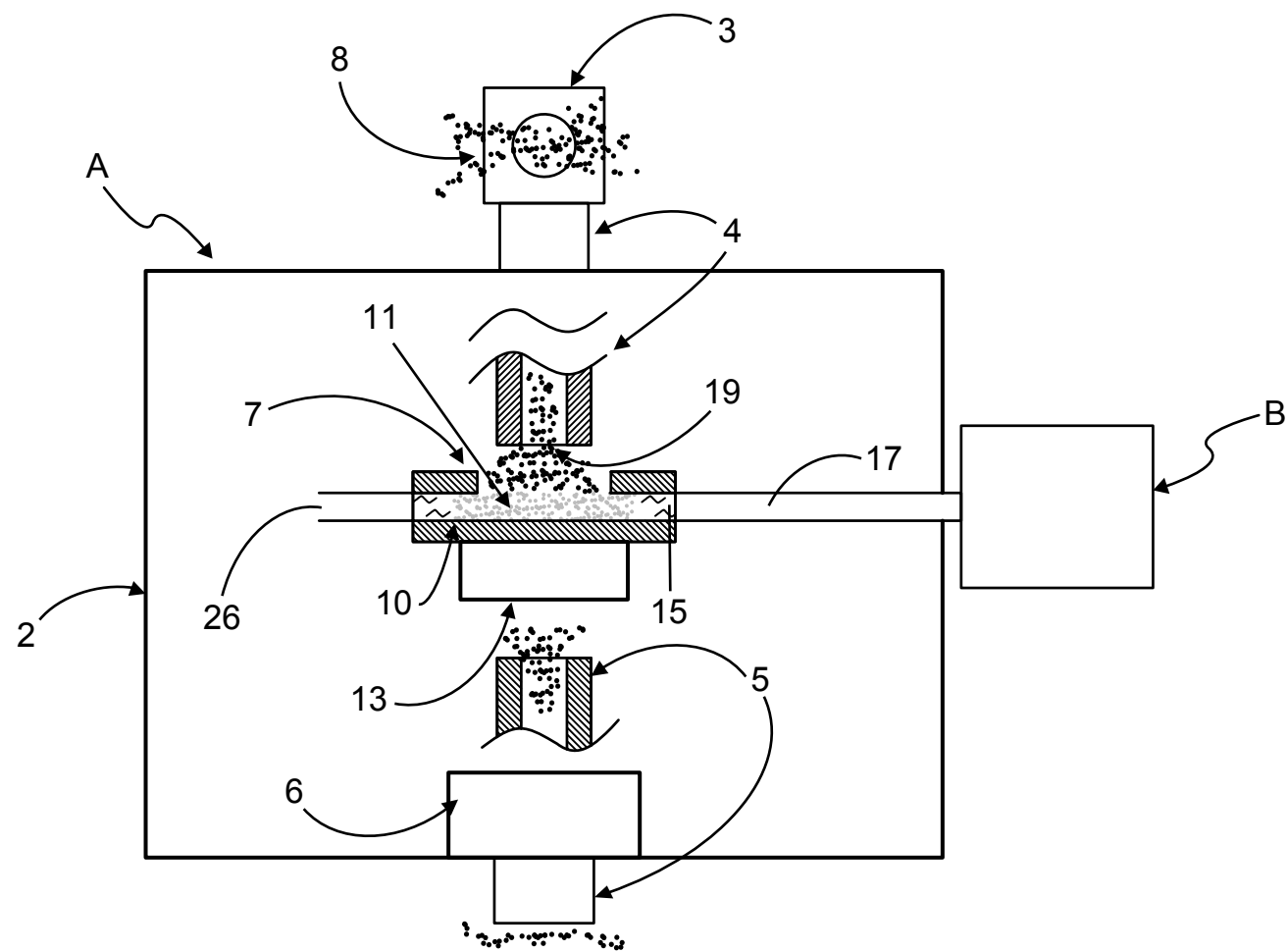


FIG. 2

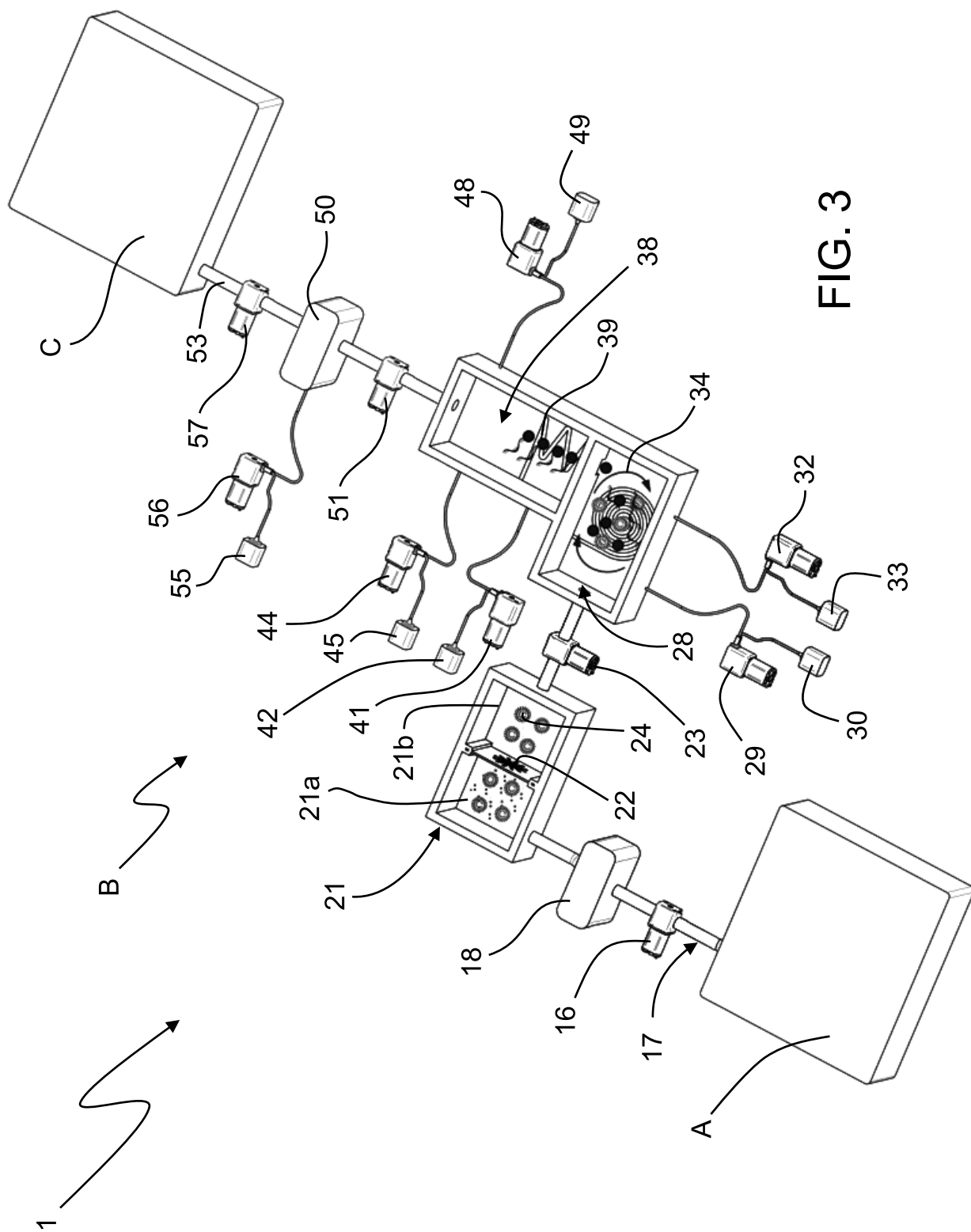


FIG. 3

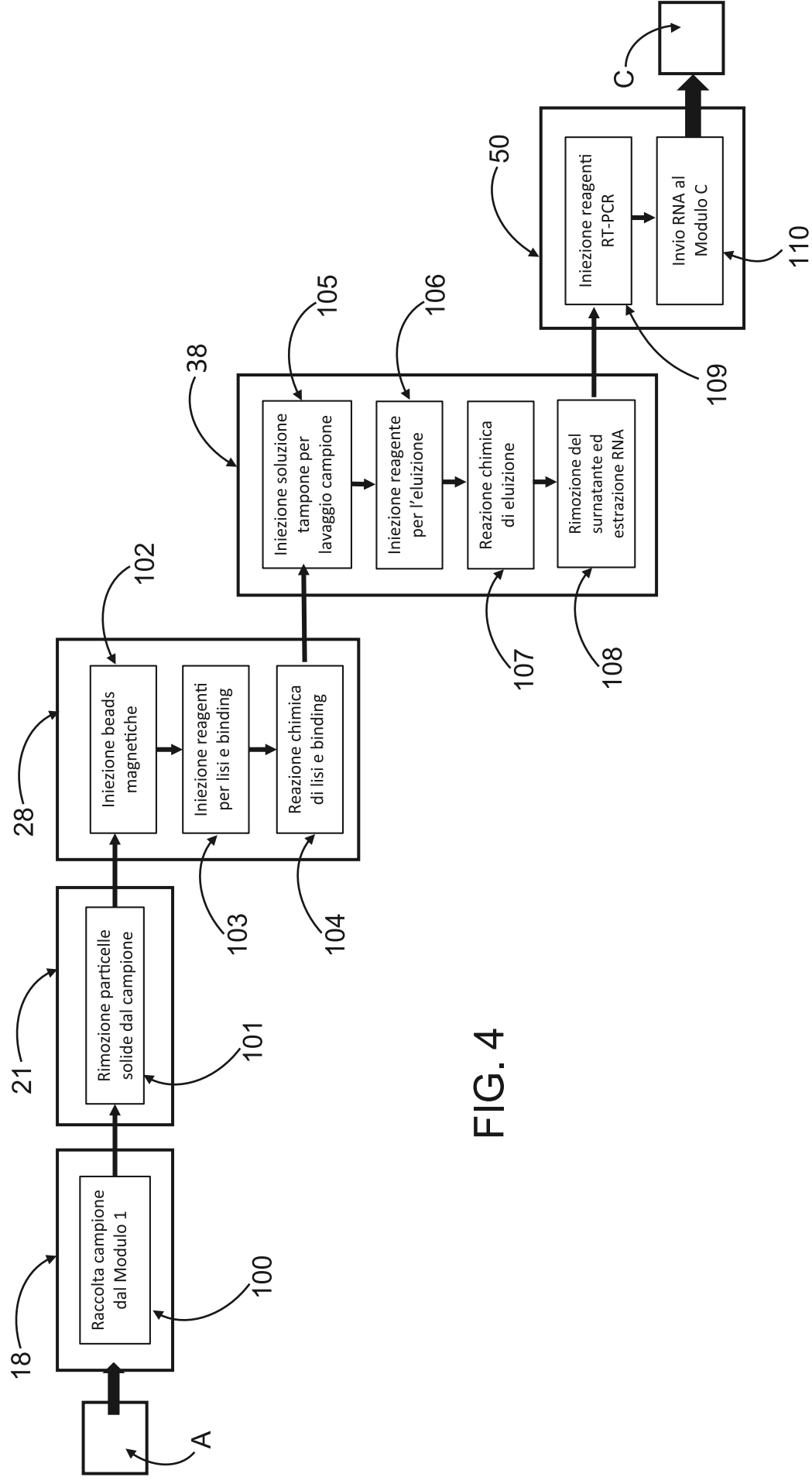


FIG. 4

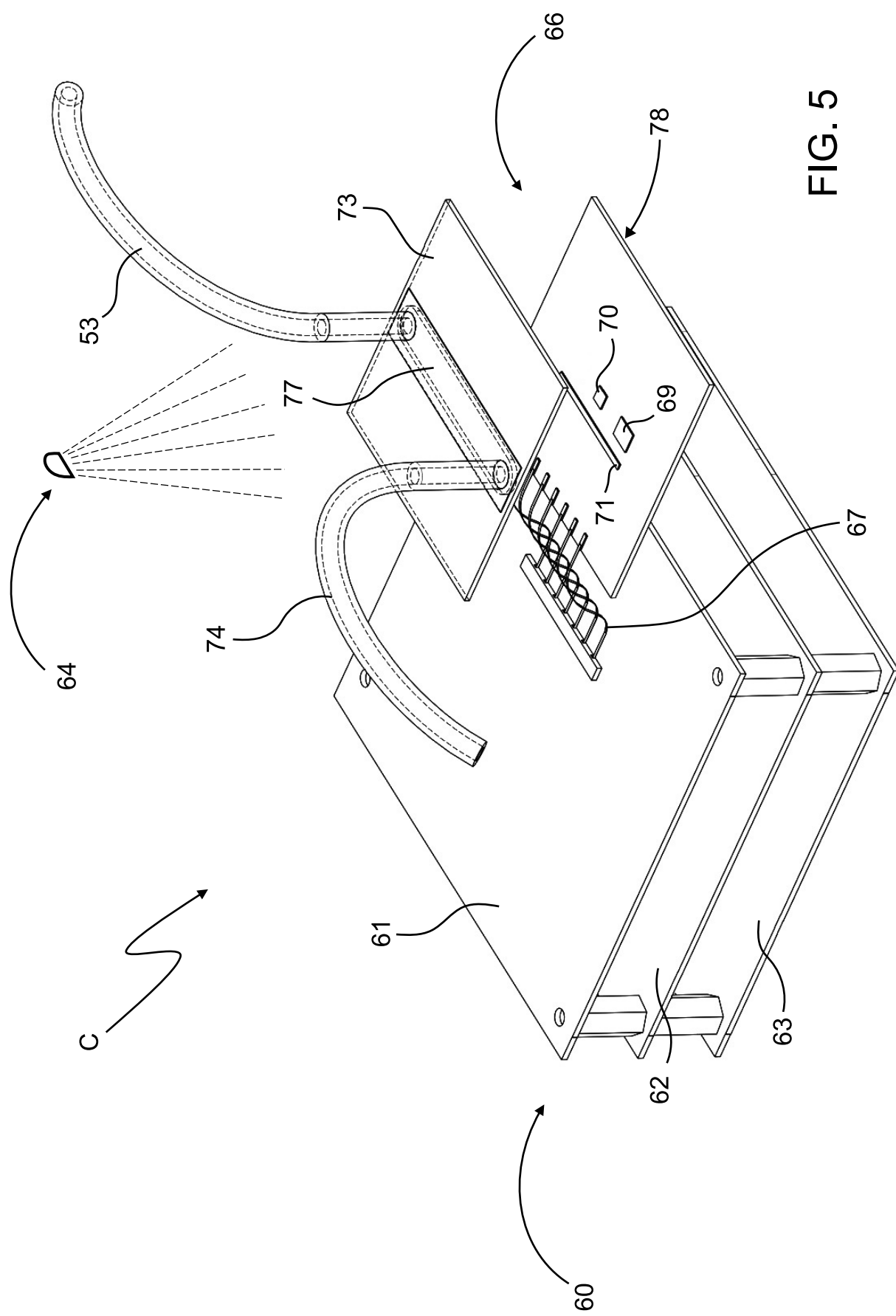


FIG. 5