

AL MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
 UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)  
 DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

**BIM 2007 A 00 0371**

MARCA  
 DA BOLLO  
 OGNI QUATTRO  
 PAGINE

**A. RICHIEDENTE**

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	<b>ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente</b>		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	<b>PG</b>	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4	<b>I- 00196 - Roma</b>		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
<b>C. TITOLO</b>	C1	<b>CITOMETRO LASER IN FLUSSO PER LA MISURA SIMULTANEA DI TAGLIA, INDICE DI RIFRAZIONE, ASFERICITA' E FLUORESCENZA DI PARTICELLE MICROSCOPICHE IN SOSPENSIONI LIQUIDE O GASSOSE</b>		



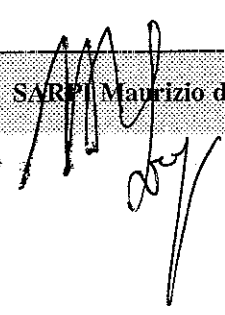
**D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)**

COGNOME E NOME	D1	<b>FIORANI, Luca</b>
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	<b>PALUCCI, Antonio</b>
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	<b>MALTSEV, Valeri</b>
NAZIONALITA'	D2	russe
COGNOME E NOME	D1	<b>SEMYANOV, Konstantin</b>
NAZIONALITA'	D2	russe
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
<b>E. CLASSE PROPOSTA</b>	E1	E2	E3	E4	E5

**F. PRIORITA'**

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL' ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO:	F2
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO o ESPOSIZIONE	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO:	F2
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO o ESPOSIZIONE	F4
<b>G CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI</b>	G1			
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	SARETTI Maurizio dello STUDIO FERRARIO 			

I MANDATARIO ABILITATO PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTONDICATA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART. 76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N. 455

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME	I1	220 SARPI Maurizio, 703 FEZZARDI Antonio, 391 MANNI Lina
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	STUDIO FERRARIO
INDIRIZZO	I3	Via Collina, 36
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	I4	I-00187 - ROMA
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	Esonero dal pagamento dei diritti - art. 2 Decreto 02/04/2007

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N ES. ALL.	N ES. RIS.	N. PAG.
PROSPETTO A DESCRIZIONE RIVENDICAZIONE	1		30
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		7
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0		
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0		

(SI / NO)

LETTERE D'INCARICO	SI
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

(EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	00/00
Foglio aggiuntivo per i seguenti paragrafi (barrare i prescelti)	A	D F
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI	
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO	
DATA DI COMPILAZIONE	03/07/2007	

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

SARPI Maurizio dallo STUDIO FERRARIO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2007 A 00 0371		
C.C.I.A.A. DI	ROMA	COD	58
IN DATA	3 luglio 2007	IL/ I RICHIEDENTE/ I SOPRAINDICATO/ I HA/ HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.		FOGLI AGGIUNTIVI PER LA REGISTRAZIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE		

*[Signature]*



L'UFFICIALE ROGANTE  
**Rosalba Pedone**

**PROSPETTO MODULO A**

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DOMANDA:

DATA DEPOSITO: **3 luglio 2007**

**A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE RESIDENZA O STATO:

**ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, di nazionalità italiana, con sede in Lungotevere Grande Ammiraglio Thaon di Revel, 76 - 00196 - Roma.**

**C. TITOLO**

**CITOMETRO LASER IN FLUSSO PER LA MISURA SIMULTANEA DI TAGLIA, INDICE DI RIFRAZIONE, ASFERICITÀ E FLUORESCENZA DI PARTICELLE MICROSCOPICHE IN SOSPENSIONI LIQUIDE O GASSOSE**

SEZIONE                      CLASSE                      SOTTOCLASSE                      GRUPPO                      SOTTOGRUPPO

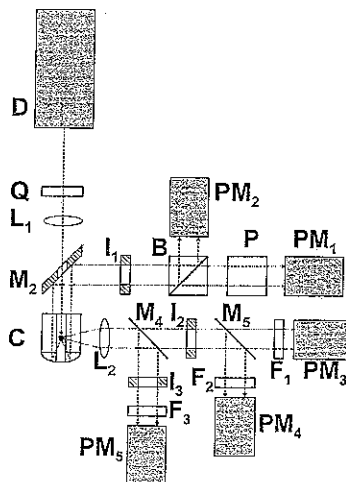
**E. CLASSE PROPOSTA**

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

**O. RIASSUNTO**

Apparato per la misura simultanea di taglia, indice di rifrazione, asfericità e fluorescenza di particelle microscopiche in sospensioni liquide o gassose, caratterizzato dal fatto che comprende, in combinazione: mezzi per la citometria laser a scansione in flusso (LSFC) atti a ricostruire taglia e indice di rifrazione delle particelle, ed opportuni mezzi per la misura della depolarizzazione o asfericità di particelle microscopiche, nonché della loro fluorescenza e/o pigmentazione.

**P. DISEGNO PRINCIPALE**



FIRMA DEI / DEI  
RICHIEDENTE / I

**SARPI Maurizio dello STUDIO FERRARIO**

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
CITOMETRO LASER IN FLUSSO PER LA MISURA SIMULTANEA DI  
TAGLIA, INDICE DI RIFRAZIONE, ASFERICITÀ E  
FLUORESCENZA DI PARTICELLE MICROSCOPICHE IN  
SOSPENSIONI LIQUIDE O GASSOSE; a nome di ENEA - Ente  
per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, con  
sede in Lungotevere Grande Ammiraglio Thaon di Revel,  
76 - 00196 - Roma.

Inventori designati: Luca FIORANI, Antonio PALUCCI,  
Valeri MALTSEV, Konstantin  
SEMYANOV.

\*\*\*\*\*

La presente invenzione riguarda sostanzialmente  
un apparato per la misura simultanea delle  
caratteristiche fisiche di particelle microscopiche  
presenti in sospensioni liquide o gassose.

Più specificamente, il trovato è relativo ad un  
citometro laser in flusso comprendente una sorgente  
di luce polarizzata circolarmente e una cella con un  
capillare. La sorgente irraggia il capillare in cui  
sono fatte fluire particelle microscopiche in  
sospensioni liquide o gassose. Ogni particella, a  
causa dell'interazione con la radiazione di luce  
coerente, emette per diffusione e fluorescenza.

Secondo l'invenzione, questa emissione è

raccolta - simultaneamente - dai canali di rivelazione della luce non polarizzata diffusa in avanti, della luce polarizzata linearmente diffusa in avanti, della luce non polarizzata diffusa lateralmente in differenti bande spettrali.

In base alle misure di emissione effettuate in questi canali, un apposito software di acquisizione permette di determinare simultaneamente e in tempo reale: taglia, indice di rifrazione, depolarizzazione (asfericità) e fluorescenza di ogni particella.

I test condotti con campioni acquosi di sfere di polistirolo, fluorescenti o non fluorescenti, e cellule di fitoplancton dimostrano che l'invenzione è capace di ricostruire taglia e indice di rifrazione con un'accuratezza dell'1% e che le misure di depolarizzazione e fluorescenza permettono di classificare particelle altrimenti indistinguibili.

La misura simultanea di taglia e indice di rifrazione di particelle microscopiche con sistemi laser è basata sulla teoria di Mie che descrive la diffusione della luce da parte di sfere dielettriche [1]. In generale, gli strumenti basati su questa tecnica prendono il nome di contatori laser di particelle [2] e citometri laser in flusso [3], a seconda che le particelle siano sospese in aria e

acqua, rispettivamente. Il grande interesse per la classificazione rapida di particelle microscopiche in sospensioni liquide (fitoplancton marino, cellule sanguigne, ecc.) ha favorito l'ampia diffusione di sistemi commerciali basati sulla citometria laser in flusso (LFC).

Le ditte più affermate in questo campo sono:

- Becton, Dickinson and Company [4],
- Beckman Coulter [5],
- Partec [6].

Nella LFC, il flusso di particelle e il fascio laser sono ortogonali. Quando la particella attraversa il fascio, la radiazione è diffusa con una distribuzione angolare che dipende da taglia e indice di rifrazione. In generale, nei sistemi commerciali ci si limita a misurare la diffusione in avanti (FSC) e la diffusione laterale (SSC), senza ricavare la taglia e l'indice di rifrazione. Spesso, la fluorescenza delle particelle è rivelata in alcune bande spettrali. Tipicamente, la diffusione in avanti è associata alla taglia della particella [7], mentre la diffusione laterale è dominata da effetti rifrattivi [8]. Sebbene si tratti di semplificazioni, questo approccio permette la classificazione rapida delle cellule in campo clinico, soprattutto se le

cellule sono marcate con anticorpi monoclonali coniugati a coloranti fluorescenti. Per quanto riguarda le applicazioni della LFC al fitoplancton marino, segnaliamo i prodotti della CytoBuoy che fabbrica sistemi da laboratorio, per boe e sottomarini [9].

E' importante osservare che, fino ad oggi, la misurazione di taglia e indice di rifrazione è sempre stata effettuata in modo separato e distinto dalla eventuale misurazione di polarizzazione (asfericità) e fluorescenza. Ciò significa che attualmente non è possibile rilevare tutti questi dati per una stessa particella perchè le suddette misure, fatte in tempi diversi, non consentono di rilevare i dati relativi ad una stessa particella.

In altre parole, rilevando la diffusione separatamente rispetto alla fluorescenza, non è possibile associare - a posteriori - dette misurazioni alla particella a cui si riferiscono.

Ad esempio, nell'ambito della caratterizzazione delle cellule fitoplanctoniche, è opportuno notare che:

- le cellule fitoplanctoniche possono essere discriminate non solo mediante taglia e indice di rifrazione, ma anche in base a forma e

pigmentazione,

- forma e pigmentazione possono essere osservate, rispettivamente, grazie alla depolarizzazione della diffusione e all'emissione di fluorescenza.

Scopo principale della presente invenzione è superare i limiti dei prodotti convenzionali fornendo un dispositivo in grado di combinare LIF, LFC e ottiche polarizzanti al fine di misurare simultaneamente taglia, indice di rifrazione, depolarizzazione o asfericità e fluorescenza di particelle microscopiche in sospensioni liquide o gassose.

Ciò è stato ottenuto, secondo il trovato, prevedendo di combinare insieme la citometria laser a scansione in flusso (LSFC) [15], capace di ricostruire taglia e indice di rifrazione, con opportuni mezzi per la misura della depolarizzazione o asfericità di particelle microscopiche.

Una migliore comprensione dell'invenzione si avrà con la seguente descrizione e con riferimento alle figure che illustrano, a puro titolo esemplificativo e non già limitativo, una preferita forma di realizzazione.

Nei disegni:



La figura 1 mostra il principio di funzionamento di un citometro laser in flusso.

La figura 2 è un esempio di dati ottenuti con un citometro laser in flusso: si noti come la fluorescenza della clorofilla permetta di distinguere il fitoplancton (nuvole di punti lungo la linea a  $45^\circ$ ) dalle altre particelle (nuvola di punti orizzontale). Osservando colture note, è possibile attribuire le nuvole di punti a tipi di fitoplancton.

La figura 3 è uno schema di FACScan (Becton, Dickinson and Company).

La figura 4 è una foto dell'invenzione: i principali elementi sono indicati con la nomenclatura seguita in Tabella 1 che segue.

La figura 5A è uno schema ottico dell'invenzione: i tre specchi di rinvio (inseriti fra D e Q) e l'ulteriore specchio di rinvio (inserito fra M2 e I<sub>1</sub>) sono ininfluenti e non sono stati indicati.

La figura 5B mostra schematicamente il percorso ottico del fascio laser e della luce diffusa dalle particelle che si riflette sullo specchio sferico sul fondo della cuvette.

La figura 6 mostra l'interfaccia del programma di acquisizione e analisi. Le tracce 1, 2 e 3

rappresentano i segnali relativi a "indicatrix", "trigger" e fluorescenza (il secondo è stato invertito per comodità di visione).

Le figure 7A e 7B sono, rispettivamente, immagini di *Chlamydomonas reinhardtii* ottenute al microscopio elettronico a scansione e al microscopio ottico ottenute.

Le figure 8A-8D sono istogrammi rispettivamente relativi a: taglia, indice di rifrazione, fluorescenza e depolarizzazione ottenuti analizzando un campione di *Chlamydomonas reinhardtii* mescolato con sfere di polistirolo fluorescenti e non fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$ .

La figura 9 è uno "Scatter plot" a due dimensioni (taglia e depolarizzazione) ottenuto analizzando un campione di *Chlamydomonas reinhardtii* mescolato con sferette di polistirolo fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$ .

La figura 10 è uno "Scatter plot" a tre dimensioni (taglia, depolarizzazione e fluorescenza) ottenuto analizzando un campione di *Chlamydomonas reinhardtii* mescolato con sferette di polistirolo fluorescenti e non fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$  (i punti più piccoli sono le proiezioni sui piani).

La figura 11 è uno "Scatter plot" a tre

dimensioni (taglia, fluorescenza a 530 nm e fluorescenza a 680 nm) ottenuto analizzando un campione preparato mescolando sfere di polistirolo fluorescenti nel verde e non fluorescenti, aventi diametro 2  $\mu\text{m}$ , con sfere di polistirolo fluorescenti nel rosso e non fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$ .

Il principio di funzionamento della LFC è illustrato in Fig. 1, un esempio di dati è fornito in Fig. 2 e un diffuso strumento commerciale è mostrato in Fig. 3.

Tipicamente, la LFC permette di acquisire simultaneamente 5 parametri: diffusione in avanti, diffusione laterale e fluorescenza in 3 bande spettrali. La velocità di conteggio può superare 10 mila particelle al minuto. Tra i vantaggi della LFC ricordiamo la facilità di preparazione del campione, l'assenza di trattamento chimico e la possibilità di effettuare misure in situ.

Secondo il trovato, si prevede un apparato comprendente:

- mezzi per illuminare le particelle da analizzare con una luce laser polarizzata circolarmente;
- un rilevatore a diffusione in avanti atto a misurare simultaneamente la luce non polarizzata e polarizzata linearmente diffusa dalle

particelle in un ampio intervallo dell'angolo polare, tipicamente tra  $5^\circ$  e  $100^\circ$ , dove i fasci non polarizzato e polarizzato sono perpendicolari;

- un rilevatore a diffusione laterale atto a misurare simultaneamente la luce non polarizzata diffusa dalle particelle nella direzione laterale e la fluorescenza delle particelle in differenti bande spettrali;
- un apposito software di acquisizione ed elaborazione atto a fornire in tempo reale taglia, indice di rifrazione e un parametro di depolarizzazione delle particelle, sulla base di dette misure di luce non polarizzata e polarizzata rilevate dal rilevatore a diffusione in avanti;
- un apposito software di acquisizione ed elaborazione atto a fornire in tempo reale l'istante di passaggio della particella in un punto noto e parametri di fluorescenza delle particelle, sulla base delle misure di luce non polarizzata e fluorescenza rilevate dal rivelatore a diffusione laterale;

dette misurazioni e/o calcoli di taglia, indice di rifrazione, depolarizzazione o asfericità e

fluorescenza essendo effettuate simultaneamente.

Nelle sperimentazioni è stato usato un laser a diodo D con rapporto di polarizzazione elevato (100:1). Tale sorgente, inoltre, è caratterizzata da potenza grande e lunghezza d'onda corta, permettendo al sistema di avere buona sensibilità e di rivelare particelle sub-micrometriche (fino a circa metà della lunghezza d'onda).

Eventualmente, è possibile aumentare il rapporto di polarizzazione inserendo nel fascio un polarizzatore come ad esempio un Glan-Taylor Thorlabs GT10 (diametro "clear aperture": 10 mm, rapporto di estinzione: 100,000:1). Il fascio 1 polarizzato linearmente, dopo essere stato rinviato da tre specchi per compattare il sistema, attraversa una lamina a quarto d'onda Q, uscendo polarizzato circolarmente. Successivamente, dopo essere stato focalizzato da una prima lente  $L_1$  e aver attraversato uno specchio forato  $M_2$ , il fascio 1 incide coassialmente su un flusso di particelle 2 in sospensione liquida che attraversa il capillare (diametro: 254  $\mu\text{m}$ ) di una cuvette C. Nella zona di interazione (lunghezza inferiore a 5 mm) il fascio ha sezione trasversale piccola (diametro attorno a 30  $\mu\text{m}$  FWHM) e quindi il flusso di energia radiante è

elevato. La luce 3 diffusa dalla particella 2 è riflessa verso lo specchio forato  $M_2$  da uno specchio sferico 4 che costituisce il fondo della cuvette C. La radiazione riflessa dallo specchio forato  $M_2$ , dopo essere stata rinvia da un apposito specchio (non mostrato) per compattare il sistema, è divisa in due parti da un "beam splitter" B non polarizzante. La parte trasmessa è rivelata da un primo fotomoltiplicatore  $PM_1$ , dopo aver attraversato un polarizzatore P, quella riflessa è rivelata così com'è da un secondo fotomoltiplicatore  $PM_2$ . Il "beam splitter" B, il polarizzatore P e detti fotomoltiplicatori  $PM_1$  e  $PM_2$  sono montati su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dallo specchio forato  $M_2$ . Un primo diaframma regolabile  $I_1$  effettua il filtraggio spaziale del fascio in ingresso.

Con riferimento alla figura 5B, è interessante notare che essendo osservata la radiazione collimata dallo specchio sferico 4, per ogni posizione della particella 2 lungo il capillare, viene rivelata solo la luce 3 proveniente da un angolo polare di diffusione ben definito. Quindi, ricostruendo la posizione in base al tempo di acquisizione del segnale, grazie alla misura della velocità della

particella 2 e dell'istante del suo passaggio in un punto noto, è possibile determinare l'intensità della diffusione in funzione dell'angolo polare ("indicatrix") in un ampio intervallo (come detto precedentemente: tipicamente tra  $5^\circ$  e  $100^\circ$ ). Infine, la taglia e l'indice di rifrazione della particella vengono ricostruiti a partire dall'"indicatrix" mediante un metodo di inversione [20] della teoria di Mie. L'istante di passaggio della particella 2 in un punto noto è misurato, come vedremo, osservando la diffusione laterale. La velocità della particella 2 è una funzione, calibrata in precedenza, delle pressioni nel circuito idrodinamico, selezionate dall'operatore.

Se le particelle 2 sono sferiche, i segnali  $I_1$  e  $I_2$ , rispettivamente in uscita dai suddetti fotomoltiplicatori  $PM_1$  e  $PM_2$ , sono uguali (a meno di un fattore costante, legato alla differente efficienza dei rispettivi canali di rivelazione, che può essere reso uguale a 1 aggiustando il guadagno dei fotomoltiplicatori).

Se, invece, le particelle non sono sferiche, la depolarizzazione:

$$\delta I = I_1 - I_2$$

è non nulla.

Quindi, la misura della depolarizzazione consente di discriminare le particelle sferiche: ciò è particolarmente utile per classificare le cellule fitoplanctoniche.

Con riferimento allo schema ottico di figura 5A, la parte del trovato relativa alla determinazione della taglia e dell'indice di rifrazione della particella ("indicatrix"), nonché della forma della particella (polarizzazione) comprende:

- un laser a diodo (405 nm) D
- una lamina a quarto d'onda Q
- una lente di focalizzazione  $L_1$
- una cuvette C
- uno specchio forato  $M_2$
- un diaframma a iride  $I_1$
- un "beam-splitter" non polarizzante B
- un polarizzatore P
- due fotomoltiplicatori  $PM_1$  e  $PM_2$

Secondo una caratteristica peculiare dell'invenzione, il dispositivo è atto a rilevare contemporaneamente anche la radiazione laterale mediante un obiettivo microscopico.

Con riferimento allo schema ottico di figura 5A, la parte del trovato relativa alla determinazione dei pigmenti della particella (fluorescenza), nonché a



rilevare il passaggio della particella in un punto noto ("trigger") comprende:

- lente di collimazione  $L_2$
- specchio dicroico  $M_4$
- diaframma a iride  $I_2$
- specchio dicroico  $M_5$
- filtro interferenziale (680 nm)  $F_1$
- fotomoltiplicatore  $PM_3$
- filtro interferenziale (530 nm)  $F_2$
- fotomoltiplicatore  $PM_4$
- diaframma a iride  $I_3$
- filtro interferenziale (405 nm)  $F_3$
- fotomoltiplicatore  $PM_5$

La luce è separata in tre zone spettrali mediante due specchi dicroici. La riflessione di un primo specchio dicroico  $M_4$  indirizza la diffusione laterale ad un quinto fotomoltiplicatore  $PM_5$  che misura l'istante di passaggio della particella in un punto noto e fornisce il "trigger" della misura. Il quinto fotomoltiplicatore  $PM_5$  è montato su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dalla particella 2. Un terzo diaframma regolabile  $I_3$  ed un terzo filtro interferenziale  $F_3$  effettuano, rispettivamente, i filtraggi spaziale e spettrale del fascio in ingresso.

Un secondo specchio dicroico  $M_5$ :

- riflette la radiazione verde ad un quarto fotomoltiplicatore  $PM_4$  che misura la fluorescenza della particella attorno a 530 nm, dopo il filtraggio spettrale effettuato da un secondo filtro interferenziale  $F_2$ ,
- trasmette la radiazione rossa ad un terzo fotomoltiplicatore  $PM_3$  che misura la fluorescenza della particella 2 attorno a 680 nm, dopo il filtraggio spettrale effettuato da un primo filtro interferenziale  $F_1$ .

I fotomoltiplicatori e i filtri interferenziali ora descritti sono montati su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dalla particella 2. Un secondo diaframma regolabile  $I_2$  effettua il filtraggio spaziale del fascio in ingresso. Una foto dell'invenzione è mostrata in Fig. 4. Gli elementi ottici sono descritti in Tabella 1.

I segnali rivelati dai fotomoltiplicatori sono amplificati dagli amplificatori "transimpedance" indicati in Tab. 1, digitalizzati da un convertitore analogico digitale ADLINK DAQ-2010 (4 canali, 14 bit, 2 MS/s) e, finalmente, memorizzati e analizzati su un personal computer industriale. L'interfaccia grafica del programma di acquisizione e analisi sviluppato

dagli inventori (FastSFC) è mostrata in Fig. 6. Una volta inserito il campione (tipicamente qualche migliaio di particelle), il sistema lo analizza in pochi minuti fornendo - per ogni particella - i dati relativi a: taglia, indice di rifrazione, depolarizzazione (o asfericità) e fluorescenza.

Verrà ora illustrato il funzionamento del trovato descrivendo la misura di un campione di *Chlamydomonas reinhardtii*, un'alga verde eucariote unicellulare, lunga circa 10  $\mu\text{m}$ , che si muove servendosi di due flagelli, lunghi circa 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 7A E 7B). Tale cellula offre un test ideale per l'invenzione avendo forma ellittica e contenendo clorofilla-a che implicano, rispettivamente, depolarizzazione non nulla e fluorescenza attorno a 680 nm. I risultati del test, illustrati in Figg. 8A-8D e Tab. 2, sono stati ottenuti con un campione di *Chlamydomonas reinhardtii* (che chiameremo semplicemente "chlamydomonas") mescolato con sfere di polistirolo fluorescenti e non fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$ , (indicate come "6  $\mu\text{m}$  F" e "6  $\mu\text{m}$  NF", rispettivamente).

Prima di tutto, osserviamo che l'invenzione misura correttamente la taglia e l'indice di rifrazione delle sfere. Infatti, i valori attesi: 6.0

$\mu\text{m}$  e 1.61 - 1.62 [19], rispettivamente, sono compatibili con i valori misurati:  $6.07 \pm 0.27 \mu\text{m}$  e  $1.629 \pm 0.022$ , rispettivamente (ottenuti mediando i risultati di  $6 \mu\text{m}$  F e  $6 \mu\text{m}$  NF), corrispondenti a errori relativi dell'1% in entrambi i casi. Inoltre, come ci attendiamo, tutte le sfere hanno depolarizzazione nulla e la fluorescenza è diversa da zero solo per  $6 \mu\text{m}$  F.

Per quanto riguarda la classificazione delle particelle, notiamo che, a causa della grande variabilità naturale nella taglia delle cellule (visibile al microscopio), il relativo istogramma è piuttosto largo ed è impossibile distinguerle dalle sfere. Anche per l'indice di rifrazione vale un discorso analogo: pur essendo significativamente diversi i valori per cellule e sfere, esiste una sovrapposizione non trascurabile negli istogrammi: una cellula può essere scambiata per una sfera e viceversa. La situazione migliora se si osserva la fluorescenza: le sfere non fluorescenti sono completamente risolte. Sfortunatamente, ci può essere ancora confusione tra sfere fluorescenti e cellule. Finalmente, se si tiene conto della depolarizzazione, è praticamente impossibile scambiare cellule e sfere.

Questi risultati sono ancora più evidenti negli

"scatter plot" a due e tre dimensioni di Fig. 9 e 10, rispettivamente, e dimostrano quanto è utile la misura della depolarizzazione per l'accurata classificazione delle particelle microscopiche: senza di essa, sarebbe stato impossibile distinguere totalmente cellule e sfere.

Per esemplificare l'utilità dell'osservazione della fluorescenza in due bande spettrali, è stato misurato un campione preparato mescolando sfere di polistirolo fluorescenti nel verde e non fluorescenti, aventi diametro 2  $\mu\text{m}$  (indicate come "2  $\mu\text{m}$  F" e "2  $\mu\text{m}$  NF", rispettivamente), con sfere di polistirolo fluorescenti nel rosso e non fluorescenti, aventi diametro 6  $\mu\text{m}$  (indicate come "6  $\mu\text{m}$  F" e "6  $\mu\text{m}$  NF", rispettivamente). Lo "scatter plot" a tre dimensioni di Fig. 11 dimostra che CLASS risolve i quattro tipi di particelle in nuvole di punti ben distinte.

Tabella 1

Elemento	Descrizione	Caratteristiche	Produttore Modello
D	Laser a diodo	$\lambda$ : 405 nm, potenza: 50 mW, rapporto di polarizzazione: 100:1	$\mu$ LS Lepton IV
M <sub>1</sub>	Specchio dielettrico a larga banda	$\varnothing$ : 25.4 mm, AOI: 45°, R>97% (400 – 750 nm)	Micos
Q	Lamina a quarto d'onda di ordine zero	$\lambda$ : 405 nm, $\varnothing$ : 12.7 mm, trattamento AR a 405 nm	Micos
L <sub>1</sub>	Lente pianoconvessa	f: 60 mm, R<3% (350 – 650 nm)	Thorlabs LA1134-A
M <sub>2</sub>	Specchio dielettrico a larga banda forato	$\varnothing$ : 25.4 mm, $\varnothing$ foro: 1 mm, R>97% (400 – 750 nm)	Micos
C	Cuvette con specchio sferico	$\varnothing$ : 5 mm, h: 5 mm	ICKC
M <sub>3</sub>	Specchio dielettrico a larga banda	$\varnothing$ : 25.4 mm, AOI: 0° – 45°, R>98% (400 – 800 nm)	Thorlabs BB1-E02
I <sub>1</sub>	Diaframma a iride variabile	$\varnothing$ : 2 mm	Thorlabs D12S
B	"Beam splitter" cubico non polarizzante	Lato: 10 mm, T e R> 40% (400 – 600 nm)	Thorlabs BS010
P	Polarizzatore di Glan-Thompson	$\varnothing$ CA: 10 mm, rapporto di estinzione 100,000:1	Thorlabs GTH10M
PM <sub>1</sub>	Modulo fotomoltiplicatore	$\lambda$ : 300 – 650 nm (picco: 420 nm), sensibilità: $4.3 \times 10^4$ A/W Connesso all'amplificatore Femto HCA-10M-100K-C	Hamamatsu H6780
PM <sub>2</sub>	Modulo fotomoltiplicatore	$\lambda$ : 185 – 650 nm (picco: 420 nm), sensibilità: $4.3 \times 10^4$ A/W Connesso all'amplificatore Analog Modules 352-1-B-1M	Hamamatsu H6780-03
L <sub>2</sub>	Obiettivo microscopico	Ingrandimento: 50 $\times$ , NA: 0.55	Zeiss LD EC Epiplan-Neofluar
M <sub>4</sub>	Specchio dielettrico	$\varnothing$ : 25.4 mm, AOI: 45°, R>90% (405 nm) T>70% (>435 nm)	Laser Components 630DRLP
I <sub>2</sub>	Diaframma a iride variabile	$\varnothing$ : 4 mm	Thorlabs D12S
M <sub>5</sub>	Specchio dielettrico	$\varnothing$ : 25.4 mm, AOI: 45°, R>90% (460 – 620 nm) T>70% (>680 nm)	Laser Components 435DRLP
F <sub>1</sub>	Filtro interferenziale	$\varnothing$ : 25.4 mm, T: 74% (680 nm), BW: 11 nm	Laser Components 680DF10
PM <sub>3</sub>	Modulo fotomoltiplicatore	$\lambda$ : 300 – 900 nm (picco: 630 nm), sensibilità: $3.9 \times 10^4$ A/W Connesso all'amplificatore Femto HCA-1M-1M-C	Hamamatsu H6780-20
F <sub>2</sub>	Filtro interferenziale	$\varnothing$ : 25.4 mm, T: 64% (530 nm), BW: 6 nm	Omega Optical 530BP5
PM <sub>4</sub>	Modulo fotomoltiplicatore	$\lambda$ : 185 – 850 nm (picco: 400 nm), sensibilità: $3.0 \times 10^4$ A/W Connesso all'amplificatore Femto HCA-1M-1M-C	Hamamatsu H6780-04
I <sub>3</sub>	Diaframma a iride variabile	$\varnothing$ : 1 mm	Thorlabs D12S
F <sub>3</sub>	Filtro interferenziale	$\varnothing$ : 25.4 mm, T: 51% (402 nm), BW: 5 nm	Omega Optical 403BP5
PM <sub>5</sub>	Modulo fotomoltiplicatore	$\lambda$ : 185 – 750 nm (picco: 420 nm), sensibilità: $5.2 \times 10^5$ A/W Connesso all'amplificatore Analog Modules 352-1-B-1M	Hamamatsu H7710-11

Tabella 2

Particella	Numero	Taglia [ $\mu$ m]		Indice di rifrazione		Depolarizzazione [a.u.]		Fluorescenza [a.u.]	
		M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
chlamydomonas	2627	8.79	1.97	1.526	0.059	17.4	4.0	26	19
6 $\mu$ m F	924	6.00	0.24	1.629	0.025	0.0	3.5	61	13
6 $\mu$ m NF	909	6.13	0.29	1.629	0.019	0.1	3.5	0	0

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Tsang L., Kong J.A., Ding K.-H., "Scattering of Electromagnetic Waves: Theories and Applications," *John Wiley & Sons*, New York, US (2001).
- [2] Provder T., Texter J., eds., "Particle Sizing and Characterization," *American Chemical Society*, Washington, US (2004).
- [3] Shapiro H.M., "Practical Flow Cytometry," *John Wiley & Sons*, New York, US (2003).
- [4] <http://bd.com>
- [5] <http://www.beckmancoulter.com>
- [6] <http://www.partec.de>
- [7] Burger D.E., Jett J.H., Mullaney P.F., "Extraction of morphological features from biological models and cells by Fourier analysis of static light scatter measurements," *Cytometry* 2, 327-336 (1982).
- [8] Salzman G.C., Mullaney P.F., Price B.J., "Light-scattering approaches to cell characterization," in "Flow Cytometry and Sorting," Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M., eds., *John Wiley & Sons*, New York, US (1979).
- [9] <http://www.cytobuoy.com>
- [10] <http://wwwrob.brindisi.enea.it/miao>

- [11] <http://www.miur.it>
- [12] <http://www.enea.it/com/Frascati/applicazionilaser.html>
- [13] <http://www.kinetics.nsc.ru>
- [14] Fiorani L., Palucci A., "Local and remote laser sensing of bio-optical parameters in natural waters," *Journal of Computational Technologies* 11, 39-45 (2006).
- [15] Maltsev V.P., "Scanning flow cytometry for individual particle analysis," *Review of Scientific Instruments* 71, 243-255 (2000).
- [16] Aristipini P., Fiorani L., Menicucci I., Palucci A., "Spettrofluorimetro laser portatile per l'analisi in situ dei liquidi non opachi," Italian Patent Number: RM2005A000269 (2005).
- [17] Maltsev V.P., Chernyshev A.V., Method and device for determination of parameters of individual microparticles," United States Patent Number: 5650847 (1997).
- [18] Fiorani L., "Une première mesure lidar combinée d'ozone et de vent, à partir d'une instrumentation et d'une méthodologie coup par coup," *Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland* (1996).
- [19] Barnaba F., Fiorani L., Palucci A., Tarasov P., "First characterization of marine particles by



laser scanning flow cytometry," *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiation Transfer* 102, 11-17 (2006).

- [20] Semyanov K.A., Tarasov P.A., Zharinov A.E., Chernyshev A.V., Hoekstra A.G., Maltsev V.P., "Single-particle sizing from light scattering by spectral decomposition," *Applied Optics* 43, 5110-5115 (2004).

## RIVENDICAZIONI:

1. Apparato per la misura simultanea di taglia, indice di rifrazione, asfericit  e fluorescenza di particelle microscopiche in sospensioni liquide o gassose, caratterizzato dal fatto che comprende, in combinazione: mezzi per la citometria laser a scansione in flusso (LSFC) atti a ricostruire taglia e indice di rifrazione delle particelle, ed opportuni mezzi per la misura della depolarizzazione o asfericit  di particelle microscopiche, nonch  della loro fluorescenza e/o pigmentazione.

2. Apparato secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che comprende:

- mezzi per illuminare le particelle da analizzare con una luce laser polarizzata circolarmente;
- un rilevatore a diffusione in avanti atto a misurare simultaneamente la luce non polarizzata e polarizzata linearmente diffusa dalle particelle in un ampio intervallo dell'angolo polare, tipicamente tra  $5^\circ$  e  $100^\circ$ , dove i fasci non polarizzato e polarizzato sono perpendicolari;
- un rilevatore a diffusione laterale atto a misurare simultaneamente la luce non polarizzata

diffusa dalle particelle nella direzione laterale e la fluorescenza delle particelle in differenti bande spettrali;

- un apposito software di acquisizione ed elaborazione atto a fornire in tempo reale taglia, indice di rifrazione e un parametro di depolarizzazione delle particelle, sulla base di dette misure di luce non polarizzata e polarizzata rilevate dal rivelatore a diffusione in avanti;
- un apposito software di acquisizione ed elaborazione atto a fornire in tempo reale l'istante di passaggio della particella in un punto noto e parametri di fluorescenza delle particelle, sulla base delle misure di luce non polarizzata e fluorescenza rilevate dal rivelatore della diffusione laterale;

dette misurazioni e/o calcoli di taglia, indice di rifrazione, depolarizzazione o asfericità e fluorescenza essendo effettuate simultaneamente.

3. Apparato secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che detti mezzi per illuminare le particelle (2) comprendono un laser a diodo (D) con rapporto di polarizzazione elevato (ad esempio 100:1).

4. Apparato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti mezzi per la determinazione della taglia e dell'indice di rifrazione della particella ("indicatrix"), nonché della forma della particella (polarizzazione), comprendono:

- un laser a diodo (405 nm) (D);
- una lamina a quarto d'onda (Q);
- una lente di focalizzazione ( $L_1$ );
- una cuvette (C);
- uno specchio forato ( $M_2$ );
- un diaframma a iride ( $I_1$ );
- un "beam-splitter" non polarizzante (B);
- un polarizzatore (P);
- due fotomoltiplicatori ( $PM_1$  e  $PM_2$ ).

5. Apparato secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che il "beam splitter" (B), il polarizzatore (P) e detti fotomoltiplicatori ( $PM_1$  e  $PM_2$ ) sono montati su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dallo specchio forato ( $M_2$ ).

6. Apparato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti mezzi per la determinazione della pigmentazione della particella (fluorescenza) e per la rilevazione del passaggio

della particella in un punto noto ("trigger")  
comprendono:

- lente di collimazione ( $L_2$ );
- specchio diecrico ( $M_4$ );
- diaframma a iride ( $I_2$ );
- specchio diecrico ( $M_5$ );
- filtro interferenziale (680 nm) ( $F_1$ );
- fotomoltiplicatore ( $PM_3$ );
- filtro interferenziale (530 nm) ( $F_2$ );
- fotomoltiplicatore ( $PM_4$ );
- diaframma a iride ( $I_3$ );
- filtro interferenziale (405 nm) ( $F_3$ );
- fotomoltiplicatore ( $PM_5$ ).

7. Apparato secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che detti fotomoltiplicatori e detti filtri interferenziali sono montati su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dalla particella (2).

8. Apparato secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detto rilevatore a diffusione laterale comprende un obiettivo microscopico.

9. Apparato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che è atto a separare la

luce in tre zone spettrali mediante due specchi dicroici ( $M_4$  e  $M_5$ ).

10. Apparato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che un primo specchio dicroico ( $M_4$ ) è atto a riflettere la diffusione laterale verso un quinto fotomoltiplicatore ( $PM_5$ ) atto a misurare l'istante di passaggio della particella in un punto noto ed a fornire il "trigger" della misura; detto quinto fotomoltiplicatore ( $PM_5$ ) essendo montato su un blocco di alluminio che permette il passaggio solo alla luce proveniente dalla particella (2).

11. Apparato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che un terzo diaframma regolabile ( $I_3$ ) ed un terzo filtro interferenziale ( $F_3$ ) sono atti ad effettuare, rispettivamente, i filtraggi spaziale e spettrale del fascio in ingresso.

12. Apparato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che un secondo specchio dicroico ( $M_5$ ) è atto a:

- riflettere la radiazione verde ad un quarto fotomoltiplicatore ( $PM_4$ ) atto a misurare la fluorescenza della particella attorno a 530 nm, dopo il filtraggio spettrale effettuato da un

secondo filtro interferenziale ( $F_2$ ),

- trasmettere la radiazione rossa ad un terzo fotomoltiplicatore ( $PM_3$ ) atto a misurare la fluorescenza della particella (2) attorno a 680 nm, dopo il filtraggio spettrale effettuato da un primo filtro interferenziale ( $F_1$ ).

13. Apparato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che un secondo diaframma regolabile ( $I_2$ ) è atto ad effettuare il filtraggio spaziale del fascio in ingresso.

14. Apparato secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che tra il laser (D) e la lente di focalizzazione ( $L_1$ ) è previsto un polarizzatore laser; detto polarizzatore laser essendo atto ad incrementare il rapporto di polarizzazione del fascio laser.

15. Apparato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che prevede una lamina a quarto d'onda per ruotare la polarizzazione del fascio laser.

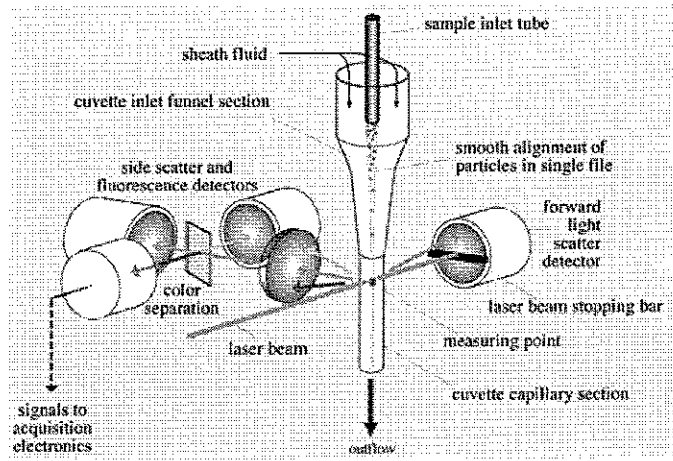
16. Apparato secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detto polarizzatore (P) è un polarizzatore di Glan-Thompson.

17. Apparato secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che detto polarizzatore

laser è un polarizzatore di Glan-Taylor.

Per il Richiedente,  
il Rappresentante.





www cytobuoy.com

Fig. 1

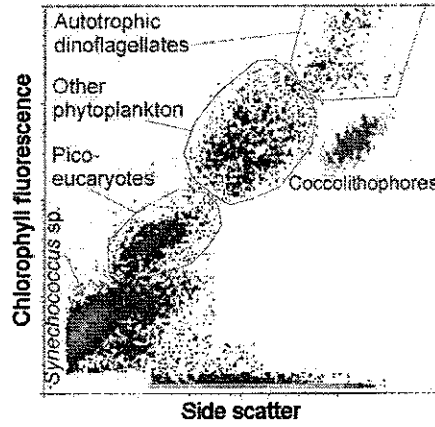


Fig. 2

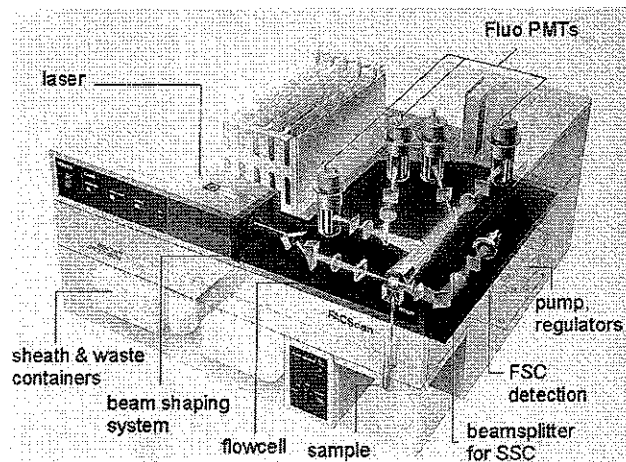


Fig. 3

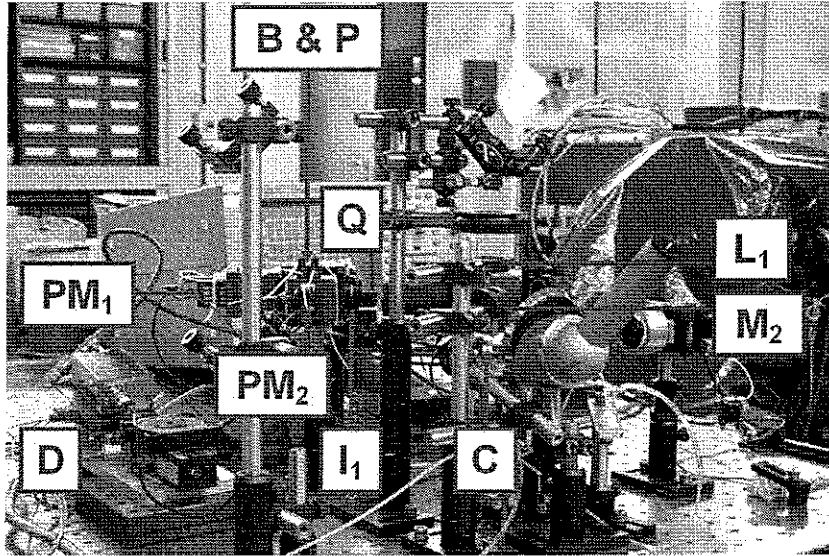


Fig. 4

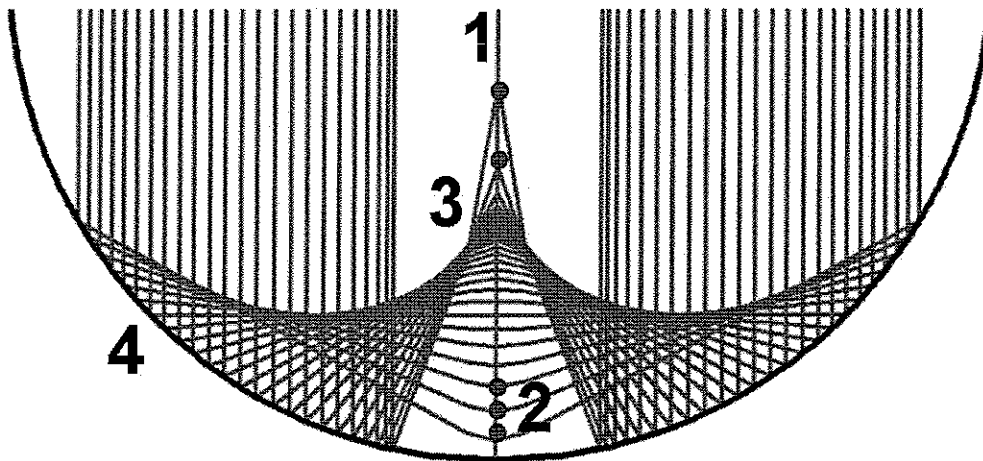


Fig. 5B

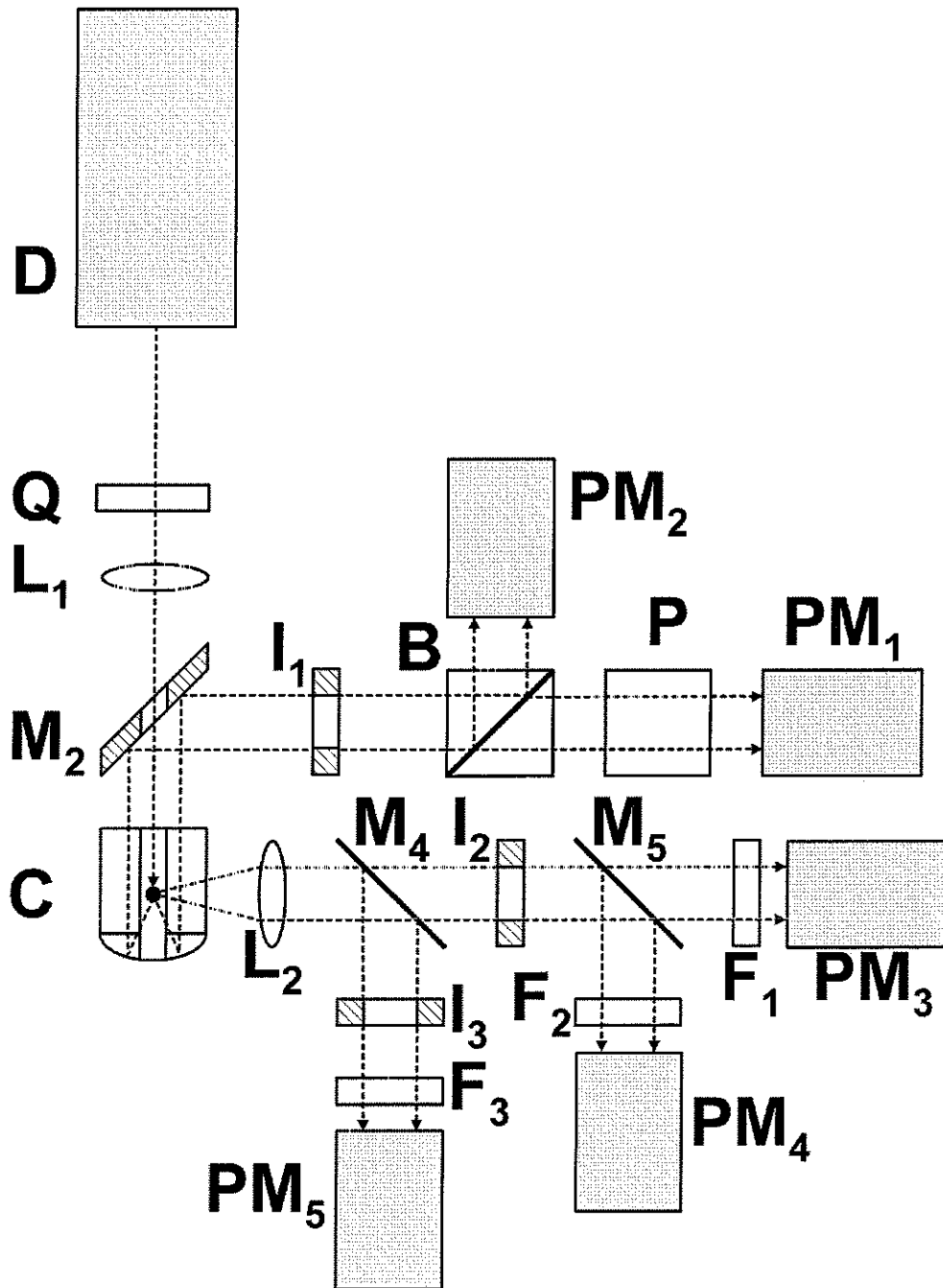


Fig. 5A

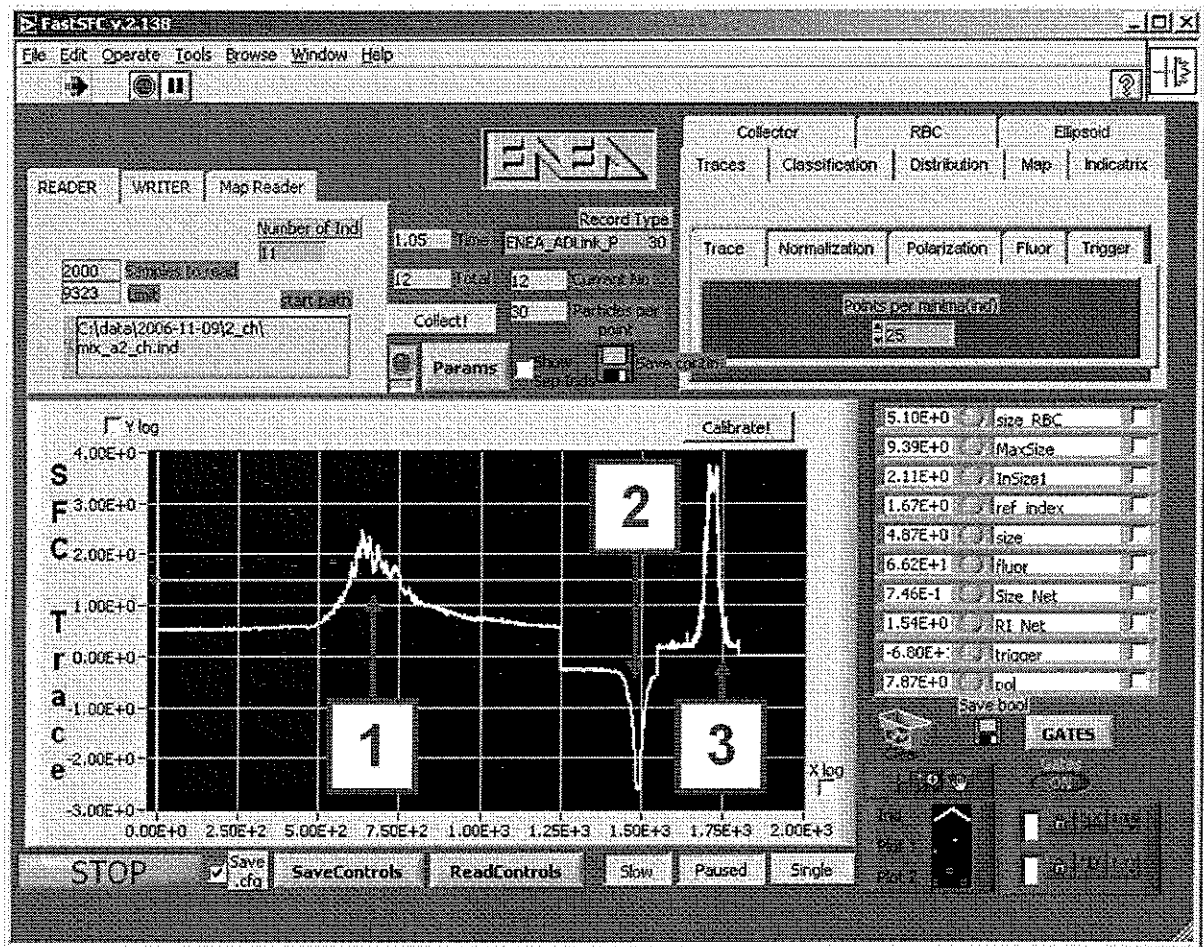


Fig. 6

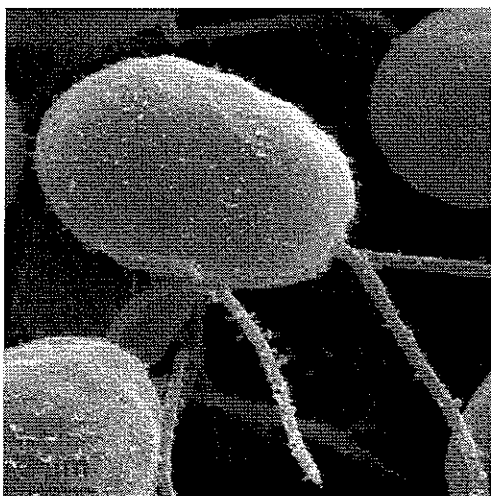


Fig. 7A

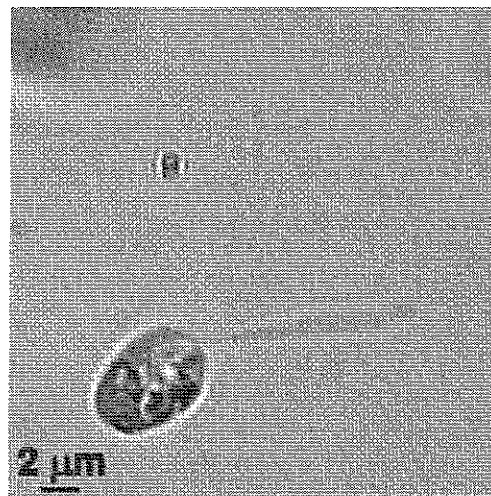


Fig. 7B

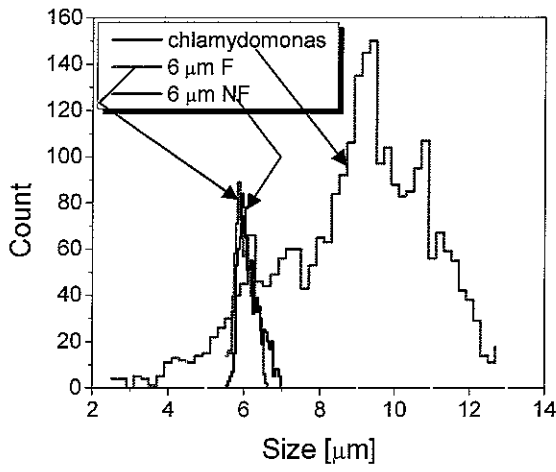


Fig. 8A

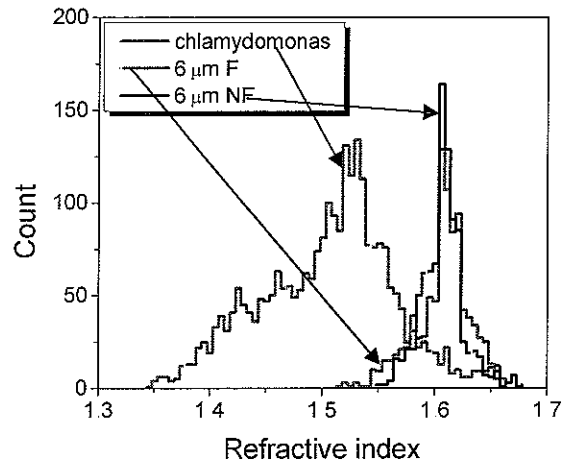


Fig. 8b

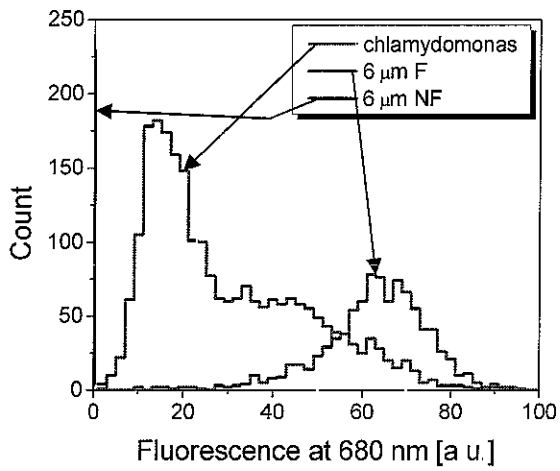


Fig. 8C

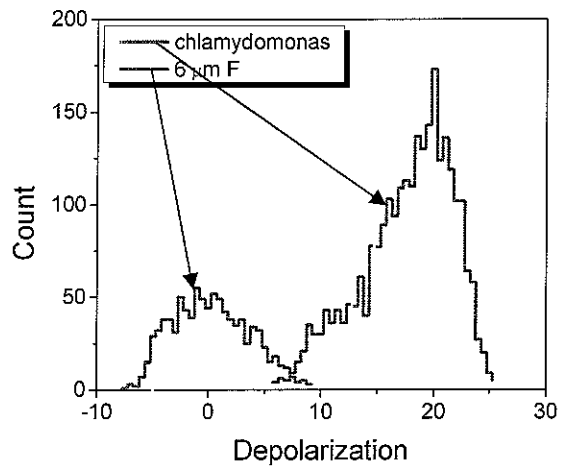


Fig. 8D

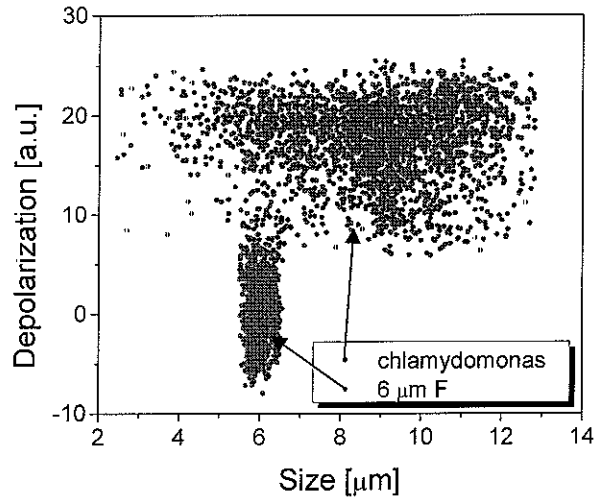


Fig. 9

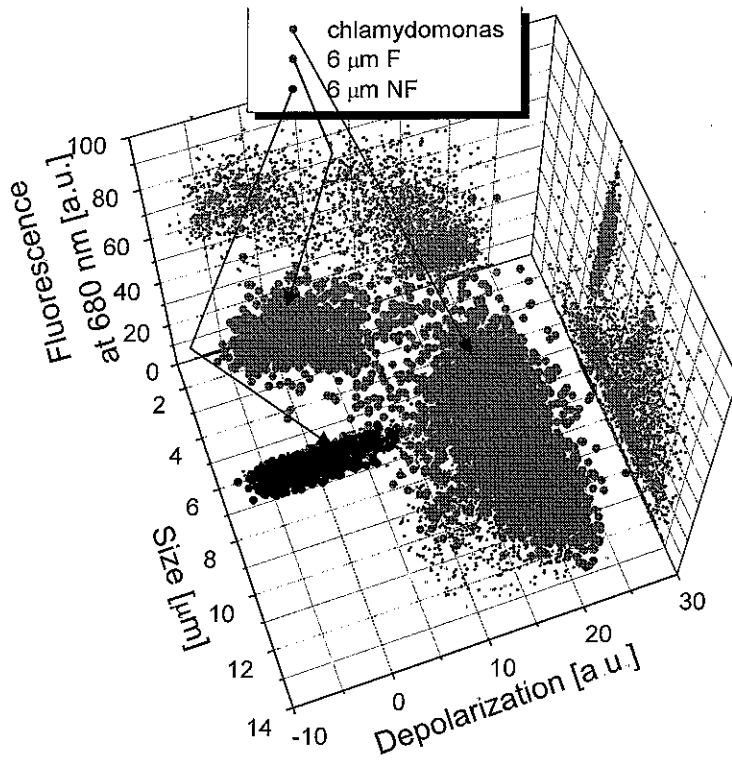


Fig. 10

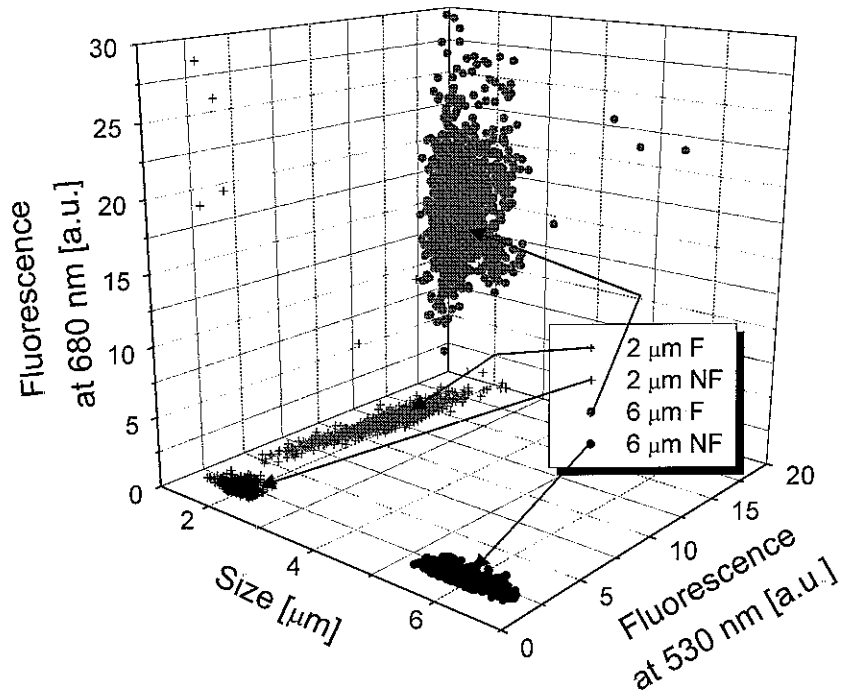


Fig. 11