



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000030557
Data Deposito	02/12/2021
Data Pubblicazione	02/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	483

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	487

Titolo

METODO E RELATIVO SISTEMA PER LA RILEVAZIONE DI UN AGENTE VIRALE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DIELETTRICA A MICROONDE

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"METODO E RELATIVO SISTEMA PER LA RILEVAZIONE DI UN AGENTE VIRALE
MEDIANTE SPETTROSCOPIA DIELETTRICA A MICROONDE"

di 1) 40% 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) 25%ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

di nazionalità italiana

con sede: VIALE REGINA ELENA 299

00161 ROMA (RM)

di 4) 10% CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

di nazionalità italiana

con sede: PIAZZALE ALDO MORO, 7

00185 ROMA (RM)

Inventori: BOLLI Pietro, BRUCALASSI Anna, CHIARUCCI Simone, CRESCI
Luca, DEL VECCHIO Ciro, DI NINNI Paola, NESTI Renzo, PANELLA Dario,
TOZZI Andrea, APOLLONIO Francesca, LIBERTI Micaela, ARGENTINI Claudio,
AMENDOLA Antonello, FIORENTINI Cristiano, FORTUNA Claudia, MARSILI
Giulia, VENTURI Giulietta, BARUCCI Marco

La presente invenzione riguarda un metodo e il relativo sistema per la rilevazione di un agente virale applicando la tecnica di spettroscopia dielettrica nella banda di frequenze delle microonde. L'invenzione trova sue forme di applicazione nel rilevamento di agenti virali, tra cui il virus SARS-CoV-2, dispersi in una soluzione isotonica.

La situazione attuale di emergenza sanitaria provocata dalla diffusione globale e incontrollata del virus SARS-CoV-2, ha messo in luce il ruolo fondamentale assunto dalle tecniche diagnostiche, quali strumenti che contribuiscono efficacemente a contrastare il dilagare della pandemia. Infatti, grazie al rilevamento tempestivo ed accurato della presenza di uno specifico agente virale in un soggetto è possibile attuare azioni mirate e tempestive a partire dall'isolamento dell'individuo risultato positivo all'infezione virale e, se necessario, alla somministrazione di un'idonea terapia farmacologica.

Gli esami di laboratorio dei campioni biologici (ad esempio del tampone rinofaringeo) sono quelli che più si prestano a rilevare tempestivamente, efficacemente e in larga misura la presenza di materiale virale e quindi fornire una diagnosi praticamente certa di infezione virale.

Ad oggi, i test diagnostici di laboratorio più comunemente utilizzati sono quelli che analizzano i campioni

biologici mediante test di reazione a catena della polimerasi (PCR) e, più precisamente mediante "real time" PCR. La "real time" PCR è una tecnica di biologia molecolare che simultaneamente amplifica frammenti di acidi nucleici virali (direttamente DNA o DNA a partire da uno stampo di RNA) e quantifica il DNA. Il campione di DNA amplificato viene analizzato e quantificato per mezzo di tecniche spettroscopiche in emissione o in assorbimento, grazie all'introduzione, in fase di reazione, di marcatori fluorescenti che si legano al DNA amplificato. Tuttavia, queste tecniche di rilevazione hanno importanti limitazioni quali la concentrazione minima di materiale biologico da analizzare per le tecniche più veloci o il tempo di analisi per quelle quantitative più significative. Inoltre, queste tecniche basate sulla rilevazione dell'acido nucleico virale devono essere eseguite in laboratori specializzati e da operatori altamente qualificati e richiedono tempi lunghi per la preparazione del campione biologico da sottoporre ad analisi. Risulta pertanto evidente che in condizioni di alta richiesta diagnostica, come durante un'emergenza pandemica, le sole tecniche molecolari non sono sufficienti.

A fronte delle limitazione connesse con le tecniche basate su PCR, metodologie alternative per la rilevazione di agenti virali sono in fase di sviluppo e alcune di esse sono già commercialmente disponibili. Tra quelle già in uso in

ambito clinico emergono i test antigenici, che rilevano la presenza di proteine virali in grado di legarsi ad anticorpi, e i test sierologici, che rilevano la presenza di anticorpi corrispondenti a un determinato antigene nel plasma sanguigno del paziente per accertarsi se è avvenuta un'esposizione ad un determinato patogeno.

Tra le tecniche in fase di sviluppo si distinguono quelle che impiegano:

- la spettrometria di massa, in base alla quale viene rilevata la presenza di proteine/peptidi virali,
- i biosensori in grado di rilevare proteine e RNA virale,
- la microscopia che adotta marcatori fluorescenti e machine learning per identificare particelle virali,
- i test che si effettuano sul respiro emesso da un soggetto, andando ad analizzare dei biomarcatori come i composti organici volatili,
- i test cutanei, per mezzo dei quali è possibile rilevare variazioni della quantità dei lipidi circolanti nel sangue (dislipidemia), conseguenti ad infezioni virali, che si manifestano a livello della pelle.

Tuttavia, le prestazioni delle tecniche diagnostiche in fase di sviluppo sopra citate sono ancora incerte sia in termini di sensibilità sia di specificità e non ancora validate dalle autorità regolatorie.

In alternativa alle recenti soluzioni diagnostiche per

la rilevazione di agenti virali, si possono inserire anche quelle tecniche che sfruttano le potenzialità della spettroscopia dielettrica a microonde.

Ad oggi, la spettroscopia dielettrica a microonde è una disciplina consolidata che utilizza radiazioni elettromagnetiche nella banda delle microonde per ricavare i parametri dielettrici di un campione sotto test. Sono noti, ad esempio, studi che sfruttano le microonde per rilevare informazioni strutturali di cellule in soluzioni biologiche, così come applicazioni di spettroscopia dielettrica per la rilevazione di componenti molecolari quali glucosio e di particelle nanometriche quali liposomi.

Tuttavia, l'impiego di spettroscopia dielettrica a microonde con funzionalità di rilevamento di agenti virali in ambito diagnostico non è ancora stato proposto.

E' pertanto scopo della presente invenzione quello di fornire un metodo alternativo per la rilevazione di un agente virale che consenta di superare i limiti precedentemente esposti e di garantire prestazioni, in termini di sensibilità e di riproducibilità dei risultati, paragonabili o addirittura superiori alle tecniche note già in uso o in fase di sviluppo.

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

Un ulteriore scopo dell'invenzione è quello di fornire

un sistema di rilevazione utilizzabile per tale metodo.

In accordo con tale ulteriore scopo, la presente invenzione è inoltre relativa a un sistema di rilevamento secondo la rivendicazione 10.

Il presente metodo permette quindi di sfruttare i vantaggi della spettroscopia dielettrica a microonde già riscontrati in un'ampia gamma di applicazioni, tra cui in ambito biologico. Infatti, la spettroscopia dielettrica a microonde è una tecnica che non necessita dell'impiego di marcatori e permette di analizzare i campioni di interesse in maniera non distruttiva e in tempi rapidi. Pertanto, il presente metodo, contrariamente ai sistemi di diagnostica basati, ad esempio, su PCR, consente di rilevare la presenza di agenti virali nella soluzione di interesse rapidamente, senza introdurre marcatori fluorescenti, senza alterare la soluzione di partenza e anche nei casi in cui gli agenti virali siano presenti in basse concentrazioni.

Più nel dettaglio, il presente metodo si basa su un approccio differenziale nel quale si effettua dapprima una misura su una soluzione di riferimento e successivamente una seconda misura in cui viene introdotto un agente virale nella soluzione di riferimento. Questo metodo permette quindi la rilevazione di un agente virale andando a caratterizzare le sue proprietà dielettriche e, principalmente, la sua permittività dielettrica relativa in funzione delle

frequenze del campo elettromagnetico applicato alla soluzione in cui l'agente virale è disperso. Essendo le proprietà dielettriche di un agente virale fortemente legate alla sua struttura molecolare, quando la radiazione elettromagnetica attraversa la soluzione di interesse, gli agenti virali dispersi in essa interagiscono con la radiazione, generando un segnale caratteristico associato alle sue intrinseche proprietà dielettriche che si distingue dai segnali associati alle proprietà dielettriche della soluzione.

In spettroscopia dielettrica a microonde, esistono diverse tecniche di misura attraverso le quali è possibile ricavare le proprietà dielettriche del campione di interesse: tra queste si possono distinguere tecniche di misurazione risonanti o non risonanti. Le tecniche di misura risonanti permettono di caratterizzare le proprietà dielettriche del campione in una singola frequenza con un'elevata precisione. Mentre le tecniche non risonanti permettono di ricavare le proprietà dielettriche del campione in un intervallo relativamente esteso di frequenze. Il presente metodo adotta una tecnica di misura non risonante utilizzando linee di trasmissione per guidare la radiazione nelle microonde verso il campione, per poi condurre il segnale di risposta, riflesso e trasmesso dal campione stesso, verso un analizzatore. Infatti, la tecnica di misura

qui adottata è denominata tecnica trasmissione/riflessione e permette di misurare sia i parametri di trasmissione che di riflessione (in entrambi i casi ampiezza e fase) su una banda di frequenze nelle microonde piuttosto larga ($f_{\text{max}}/f_{\text{min}}=1.5$); ciò consente di ottenere un'informazione molto completa sul materiale dielettrico sotto test.

In aggiunta, il presente metodo sfrutta vantaggiosamente una tecnica differenziale tra due misure sequenziali; vengono così rimossi gli errori sistematici dovuti alla struttura di misura (imperfezioni del campione o del porta-campione o della linea di trasmissione) e allo strumento di misura (problema di calibrazione), così come i segnali indesiderati ("rumore") presenti nel circuito di misura.

Un ulteriore vantaggio del presente metodo è attribuibile al fatto che tale metodo permette di ricavare in modo diretto le proprietà dielettriche intrinseche della soluzione di riferimento e, successivamente per confronto, dell'agente virale.

La presente invenzione verrà ora descritta con riferimento ai disegni annessi, in cui:

la figura 1 è uno schema di un sistema di rilevazione per attuare le fasi sperimentali del metodo secondo l'invenzione;

le figura 2 è una vista frontale di un porta-campione secondo l'invenzione;

le figure 3 e 4 sono sezioni lungo le linee III-III e IV-IV in figura 2;

la figura 5 è una vista prospettica del porta-campione di figura 2;

la figura 6 mostra nel dettaglio alcuni elementi del sistema di rilevazione di figura 1;

la figura 7 è un diagramma di flusso in cui sono illustrate le fasi del metodo della presente invenzione;

le figure 8 e 9 sono due diagrammi di flusso in cui sono illustrate le fasi di elaborazione dei dati del metodo di figura 7 con modelli matematici;

la figura 10 mostra qualitativamente l'ampiezza dei parametri di scattering in riflessione e in trasmissione nel dominio del tempo acquisiti sperimentalmente in una fase del metodo secondo l'invenzione;

le figure 11 e 12 mostrano l'andamento dei parametri di scattering in riflessione e in trasmissione, rispettivamente, al variare della frequenza ottenuti da misure sperimentali condotte utilizzando il sistema di rilevazione di figura 1;

la figura 13 è relativa all'andamento della costante di attenuazione e delle costanti di propagazione in funzione delle frequenze calcolate in accordo con la fase di

elaborazione dei dati di figura 9;

le figure 14 e 15 mostrano l'andamento della permittività dielettrica relativa ϵ_r e della tangente di perdita $\tan\delta$, rispettivamente, in funzione delle frequenze calcolate in accordo con la fase di elaborazione dei dati di figura 8;

le figure 16 e 17 mostrano l'andamento della costante dielettrica relativa ϵ_r e della tangente di perdita $\tan\delta$, rispettivamente, in funzione delle frequenze calcolate in accordo con la fase di elaborazione dei dati di figura 9;

la figura 18 mostra l'andamento della parte reale della permittività dielettrica al variare della frequenza per una soluzione di riferimento e per una soluzione contenente un agente virale;

la figura 19 mostra la differenza dei valori di permittività, indicati in figura 18, tra la soluzione contenente un agente virale e la soluzione di riferimento;
e

le figure 20 e 21 mostrano due contrasti ottenuti a partire da dati sperimentali acquisiti durante due sessioni distinte di misurazioni.

Con riferimento alla figura 1, è illustrato un sistema di rilevazione 1, mediante il quale viene attuata parte del metodo secondo l'invenzione.

Il sistema di rilevazione 1 comprende un analizzatore

di rete vettoriale (VNA) 2 provvisto di almeno due porte (porta 1, P1, e porta 2, P2), un porta-campione 3 atto a contenere un campione 4 da sottoporre a test, e due linee di trasmissione 5 che collegano le porte P1 e P2 del VNA 2 al porta-campione 3.

Il porta-campione 3 è illustrato nelle figure da 2 a 5 e comprende una piastra 6 avente una porzione centrale cava 7 provvista di una cavità 8 rettangolare passante e definente una guida d'onda 9 e una flangia 10 perimetrale di fissaggio. In una forma preferita del porta-campione 3, la guida d'onda 9 è a sezione rettangolare, in cui a è il lato maggiore.

Preferibilmente, la guida d'onda 9 è del tipo WR28 (dimensioni trasversali: 7.1 mm x 3.6 mm) operante nella banda di frequenze compresa tra 26 GHz e 40GHz.

La piastra 6 presenta, su facce opposte della porzione centrale 7, due sedi 11 rettangolari in lieve recesso rispetto allo spessore della flangia 10, nelle quali sono applicati rispettivi elementi di contenimento 12, ad esempio film ermetici adesivi trasparenti alle microonde per chiudere assialmente la cavità 8 atta ad alloggiare il campione, che risulta pertanto confinato lateralmente dalle superfici interne della cavità 8 e assialmente dalla coppia di elementi di contenimento 12. La distanza tra gli elementi di contenimento 12, cioè lo spessore della porzione centrale 7 della piastra 6, definisce una lunghezza L_d della guida

d'onda 9. La lunghezza L_d è scelta in modo da alloggiare un volume di campione 4 contenente una quantità sufficiente di materiale biologico e garantire comunque un adeguato livello del segnale acquisito dal momento che l'attenuazione del segnale lungo la guida d'onda 9 è dell'ordine di circa 20 dB/mm.

In una forma di attuazione preferita dell'invenzione, il porta-campione 3 ha una lunghezza L_d pari a 3 mm, corrispondente a un volume di liquido pari a 75 mm^3 . Tali dimensioni consentono di raggiungere un buon compromesso tra il livello di attenuazione del segnale rilevato e la quantità di soluzione da testare.

Le porte P1, P2 del VNA 2 (figura 1) sono connesse al porta-campione 3 tramite le rispettive linee di trasmissione 5 atte a trasmettere sia i segnali di input dal VNA 2 al campione 4 sia i segnali di output dal campione 4 verso il VNA 2. Le linee di trasmissione 5 sono preferibilmente di tipo coassiale e sono connesse al porta-campione 3 mediante rispettivi adattatori 13 cavo coassiale/guida d'onda per garantire continuità di propagazione delle radiazioni nelle microonde.

Gli adattatori 13 sono provvisti di flange 14 terminali rettangolari fissate a lati opposti della flangia 10 del porta-campione 3. Le flange 10 e 14 sono dotate allo scopo di fori 15 disposti in prossimità dei loro vertici, per il

fissaggio meccanico tramite viti 16 (figura 6).

Grazie alla presenza delle sedi 11 nel porta-campione 3, che alloggiavano gli elementi di contenimento 12, viene assicurata una perfetta continuità elettrica tra le flange 14 e la flangia 10.

La figura 6 mostra in dettaglio la porzione del sistema di rilevazione 1 in prossimità del porta-campione 3. In successione e simmetricamente a partire dal porta-campione 3 sono illustrati gli adattatori 13 muniti di flange 14 e le linee di trasmissione 5.

Tornando alla figura 1, benché l'interfaccia del VNA sia costituita dalle porte P1 e P2, l'interfaccia effettiva dello strumento con il porta-campione 3 è costituita dalle porte indicate con M1 e M2 direttamente collegate con il porta-campione stesso (in pratica, definite dai piani C1, C2 di contatto tra le flange 14 degli adattatori 13 ed il porta-campione 3). Tramite una procedura di calibrazione di tipo noto e qui non descritta in dettaglio, è possibile filtrare gli effetti sui segnali prodotti dalle linee di trasmissione 5 e dagli adattatori 13 in modo da "leggere" soltanto i segnali restituiti dal porta-campione 3 come se fosse collegato direttamente alle porte P1 e P2 del VNA 2.

Ai fini di un'elaborazione corretta dei segnali sperimentali acquisiti, è necessario considerare non soltanto il porta-campione 3 di lunghezza assiale L_d , ma

anche due extra porzioni 18 e 19 di lunghezza assiale L_1 e L_2 , rispettivamente, che si estendono tra ciascuna delle porte M1 e M2 e le sezioni D1, D2 di interfaccia tra il campione 4 e i rispettivi elementi di contenimento 12.

Le due extra porzioni 18 e 19 devono essere trattate come due porzioni di guida d'onda vuote che rappresentano gli effetti sulla propagazione della radiazione elettromagnetica dovuti a discontinuità elettriche e geometriche del porta-campione 3 come, ad esempio, alla presenza della coppia di elementi di contenimento 12 e alle relative sedi 11. E' pertanto più corretto affermare che il porta-campione 3 ha una lunghezza assiale L complessiva data dalla lunghezza reale L_d (nota) e dalle lunghezze L_1 e L_2 delle due extra porzioni 18 e 19 (calcolabili come descritto in dettaglio nel seguito).

La figura 7 illustra un diagramma di flusso di un metodo per la rilevazione di un agente virale secondo la presente invenzione.

Il metodo comprende, in sequenza, una prima fase di misura 101 delle proprietà dielettriche di un campione di riferimento, una seconda fase di misura 102 delle proprietà dielettriche di un campione sotto test contenente un agente virale, una fase 108 di confronto tra le proprietà dielettriche ottenute dalle fasi di misura 101 e 102 e una fase 109 di rilevazione dell'agente virale. A loro volta, la

prima e la seconda fase di misura comprendono rispettive serie di fasi sequenziali (da 103 a 107) uguali tra loro ed applicate rispettivamente al campione di riferimento e al campione sotto test.

Nella prima fase di misura 101 il campione di riferimento è costituito da una soluzione acquosa di riferimento, preferibilmente una soluzione tampone isotonica, ad esempio un tampone fosfato salino (PBS) contenente idrogenofosfato di disodio (Na_2HPO_4), cloruro di sodio (NaCl) e, in alcune formulazioni, cloruro di potassio (KCl) e diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4).

La fase 103a della prima fase di misura 101 prevede di inserire la soluzione di riferimento nel porta-campione 3. La successiva fase 104a comprende l'operazione di trasmettere al campione 4 segnali nella banda di frequenza delle microonde compresa tra 26 e 40 GHz.

In una successiva fase 105a vengono acquisiti tramite il VNA 2 segnali di risposta in riflessione e in trasmissione dal campione 4.

Nella successiva fase 106a vengono elaborati i segnali di risposta mediante operazioni di post-processing descritte in dettaglio nel seguito.

Infine, nella fase 107a vengono calcolate le proprietà dielettriche del campione di riferimento (principalmente, permittività dielettrica relativa e tangente di perdita).

Le fasi 103b-107b della seconda fase di misura 102 corrispondono alle fasi 103a-107a descritte, con l'unica differenza che il campione sotto test non è una soluzione isotonica di riferimento, ma è la stessa soluzione comprendente un agente virale.

L'agente virale utilizzato in una fase di sperimentazione del presente metodo è una particella virus-simile (Virus Like Particles, VLP). Nel dettaglio, le VLP sono particelle ingegnerizzate simili a virus e ampiamente utilizzate in molti settori della ricerca scientifica in quanto possono essere manipolate senza osservare protocolli di sicurezza come invece è richiesto quando si trattano virus autentici, ossia contenenti materiale genetico virale. E' generalmente riconosciuto che le VLP mimano l'organizzazione e la conformazione dei virus autentici. Ne consegue che, anche le proprietà dielettriche delle VLP risultano analoghe a quelle dei corrispondenti virus autentici e infettivi. Pertanto, il metodo della presente invenzione, validato per il rilevamento delle VLP, risulta valido anche per la rilevazione del corrispondente virus infettivo.

In una forma preferita di attuazione del presente metodo, le VLP utilizzate sono particelle simili a quelle del virus dell'HIV/SIV, ma assolutamente non infettive in quanto prive del genoma virale. Quest'ultime quindi necessitano di un livello di biosicurezza pari a 1. La parte

interna delle particelle è caratterizzata dal nucleo del virione SIV (SIV-GAG) a cui è stato associato il gene esprime GFP (Green Fluorescent Protein). Il rivestimento è caratterizzato dalla proteina di superficie dell'HIV modificata per formare un trimero stabile in grado di promuovere la produzione di anticorpi neutralizzanti.

Alle fasi di misura 101 e 102, segue la fase 108 di confronto o, più propriamente di analisi differenziale, tra le proprietà dielettriche calcolate nelle fasi 107a e 107b. La differenza tra le proprietà dielettriche ricavate dalla prima misura 101 e dalla seconda misura 102 è indicativa della presenza di agente virale. Dall'analisi differenziale della fase 108 eseguita nel dominio delle frequenze, è possibile estrarre una risposta spettroscopica specifica associata all'agente virale.

Con riferimento alle figure 8 e 9 vengono ora descritte le fasi di elaborazioni 106a e 106b, indicate collettivamente con 106, a partire dai parametri di scattering in riflessione (s_{11} e s_{22}) e in trasmissione (s_{21} e s_{12}) acquisiti sperimentalmente nelle fasi 105a e 105b. In breve, dai parametri di scattering acquisiti dal VNA, si ricavano le lunghezze L_1 e L_2 delle due extra porzioni 18 e 19. Conoscendo le lunghezze L_1 e L_2 delle due extra porzioni 18 e 19, si ottengono i parametri di scattering effettivi in trasmissione (S_{11} e S_{22}) e in riflessione (S_{12} e S_{21}) associati

alle due interfacce D1 e D2. Da questi, applicando modelli matematici, si ricava il fattore di propagazione P nel campione 4, il coefficiente di riflessione Γ alle interfacce D1 e D2, e, infine, le proprietà dielettriche del campione 4, quali la permittività dielettrica relativa ϵ_r e la tangente di perdita $\tan\delta$.

Tutto il procedimento matematico di calcolo delle proprietà dielettriche a partire dai parametri di scattering misurati è indicato come "il problema inverso".

Molte equazioni e aspetti teorici che verranno a breve presentati rientrano nella teoria sulla propagazione delle onde elettromagnetiche trattata per esempio in R. E. Collin, *Foundation for Microwave Engineering*, Wiley, 2001 e in C. A. Balanis, *Advanced Engineering Electromagnetics*, Wiley, 1989. Il problema della caratterizzazione delle proprietà dielettriche di una soluzione liquida è affrontato come problema generale di caratterizzazione di un materiale dielettrico in una struttura di propagazione delle onde, secondo il metodo generale di trasmissione/riflessione descritto ad esempio in L. F. Chen et al., *Microwave Electronics: Measurements and Materials Characterization*, John Wiley & Sons, 2004 e in J. Baker-Jarvis et al. Improved technique for determining complex permittivity with the transmission and reflection method, in *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, vol. 38, pp. 1096-1103,

Aug. 1990.

In figura 8, la fase 106 è relativa a una trattazione approssimata del problema inverso, mentre in figura 9 la fase 106 considera il problema inverso completo. Le fasi 110 e 111 sono comuni sia al problema inverso in forma approssimata sia alla risoluzione completa del problema inverso, e riguardano il calcolo delle lunghezze L_1 e L_2 delle due extra porzioni 18 e 19 e la determinazione dei parametri di scattering effettivi (S_{11} , S_{22} , S_{12} e S_{21}) alle interfacce D1 e D2.

Nel dettaglio, la fase 110 consiste nel trasformare i parametri di scattering (s_{11} , s_{22} , s_{12} e s_{21}) acquisiti nel dominio delle frequenze nei corrispondenti parametri di scattering nel dominio del tempo applicando la trasformata di Fourier discreta inversa.

Come mostrato in figura 10, le curve presentano picchi associati con le discontinuità geometriche o elettriche lungo la guida d'onda, in particolare due picchi s_{11} e s_{22} corrispondenti alla posizione delle interfacce con il liquido, e picchi s_{21} e s_{12} sostanzialmente coincidenti corrispondenti alla lunghezza totale della guida d'onda. L'ampiezza di questi ultimi è coincidente data la reciprocità del percorso. I tempi di ritardo dei picchi sono intesi come ritardi di gruppo delle onde. Per quanto concerne s_{11} , il ritardo di gruppo t_{g11} corrisponde con il percorso dell'onda

avanti e indietro dalla porta M1 all'interfaccia D1 più vicina a M1. Pertanto, t_{g11} corrisponde al tempo impiegato dall'onda per propagarsi avanti e indietro lungo la lunghezza L_1 dell'extra porzione 18. Analogamente, il ritardo di gruppo t_{g22} corrisponde al tempo impiegato dall'onda per propagarsi avanti e indietro lungo la lunghezza L_2 dell'extra porzione 19. Prendendo in considerazione i parametri di scattering in riflessione (s_{11} e s_{22}) è quindi possibile calcolare le lunghezze L_1 e L_2 in base alle seguenti relazioni:

$$L_1 = \frac{\tau_{g11}v_g}{2}; L_2 = \frac{\tau_{g22}v_g}{2} \quad (1)$$

in cui v_g è la velocità di gruppo in una guida d'onda vuota, avente la stessa sezione della guida d'onda 9.

Note le lunghezze L_1 e L_2 , si procede con il calcolo dei parametri di scattering effettivi con riferimento alle interfacce D1 e D2 (fase 111) in base alle relazioni:

$$\begin{cases} S_{11} = s_{11}e^{-j\gamma_a L_1} \\ S_{21} = s_{21}e^{-j\gamma_a(L_1+L_2)} \\ S_{12} = s_{12}e^{-j\gamma_a(L_1+L_2)} \\ S_{22} = s_{22}e^{-j\gamma_a L_2} \end{cases} \quad (2)$$

in cui γ_a è la costante di propagazione complessa in una guida d'onda rettangolare vuota di dimensioni trasversali a e b , in cui a è la dimensione maggiore.

Alle fasi 110 e 111, in figura 8 segue la fase 112 in cui si assume il coefficiente di riflessione Γ all'interfaccia D1 e D2 equivalente al parametro di scattering effettivo in riflessione (S_{11} o S_{22}), ossia

$$\Gamma \cong \Gamma_{11} = S_{11} \cong \Gamma_{22} = S_{22} \quad (1)$$

Questa approssimazione presuppone che gli effetti di riflessione multipla alle interfacce D1 e D2 siano trascurabili per l'attenuazione elevata delle radiazioni attraverso il liquido.

Noti i coefficienti di riflessione Γ_{11} e Γ_{22} , associati a due misure sperimentali differenti, è possibile calcolare l'impedenza (fase 113) in base alle relazioni:

$$\begin{cases} Z_{d11} = Z_a \frac{1 + \Gamma_{11}}{1 - \Gamma_{11}} \\ Z_{d22} = Z_a \frac{1 + \Gamma_{22}}{1 - \Gamma_{22}} \end{cases} \quad (4)$$

in cui Z_a è l'impedenza di una guida d'onda vuota equivalente.

L'impedenza è strettamente correlata ai parametri dielettrici, quali la permittività dielettrica relativa ϵ_r e la tangente di perdita $\tan\delta$, in base alla relazione

$$Z_d = \frac{\zeta_0}{\sqrt{\epsilon_r} \sqrt{\Delta_d - j \tan \delta}} \quad (5)$$

in cui ζ_0 è l'impedenza del vuoto, mentre Δ_d è il fattore di dispersione della guida d'onda 9 dato da

$$\Delta_d = 1 - \frac{1}{\epsilon_r} \left(\frac{c}{2af} \right)^2 \quad (6)$$

in cui c è la velocità della luce nel vuoto, a è il lato maggiore della sezione della guida d'onda e f è la frequenza.

Usando la notazione polare, l'impedenza si rappresenta

come

$$Z_{dii} = |Z_{dii}|e^{j\varphi_{ii}} \quad (7)$$

in cui $|Z_{dii}|$ è il modulo, φ_{ii} la fase e $ii=11$ o $ii=22$.

Combinando la relazione (5) e (7), è possibile calcolare direttamente la permittività dielettrica relativa ϵ_r e la tangente di perdita $\tan\delta$ (fase 107) dall'impedenza, secondo le seguenti relazioni

$$\begin{cases} \epsilon_{rii} = \left(\frac{c}{2af}\right)^2 + \frac{\zeta_0^2}{|Z_{dii}|^2 \sqrt{1 + \tan^2(2\varphi_{ii})}} \\ \tan \delta_{ii} = \Delta_d \tan(2\varphi_{ii}) \end{cases} \quad (8)$$

Accanto alle soluzioni del problema inverso in forma approssimata, è sempre possibile calcolare i parametri dielettrici risolvendo il problema inverso completo, come illustrato in figura 9. Secondo questo procedimento, gli effetti delle riflessioni multiple non sono trascurabili, e pertanto non è consentito assumere i coefficienti di riflessione Γ alle interfacce D1 e D2 equivalenti ai parametri di scattering effettivi in riflessione (S_{11} e S_{22}).

Per questo motivo alla fase di calcolo dei parametri di scattering effettivi (fase 111), segue il calcolo analitico del coefficiente di riflessione Γ e del fattore di propagazione P (fase 114), dati da

$$\begin{cases} \Gamma_{11} = Q(S_{11}, S_{21}) \pm \sqrt{1 + Q^2(S_{11}, S_{21})} \\ P_{21} = Q(S_{21}, S_{11}) \pm \sqrt{1 + Q^2(S_{21}, S_{11})} \end{cases} \quad (9)$$

a partire dai parametri di scattering effettivi S_{11} e

S_{21} , e dati da

$$\begin{cases} \Gamma_{22} = Q(S_{22}, S_{12}) \pm \sqrt{1 + Q^2(S_{22}, S_{12})} \\ P_{12} = Q(S_{12}, S_{22}) \pm \sqrt{1 + Q^2(S_{12}, S_{22})} \end{cases} \quad (10)$$

a partire dai parametri di scattering effettivi S_{22} e S_{12} , in cui $Q(S_{11}, S_{21})$ e, similmente $Q(S_{21}, S_{11})$, $Q(S_{22}, S_{12})$, $Q(S_{12}, S_{22})$, corrisponde a

$$Q(S_{11}, S_{21}) = \frac{1 + S_{11}^2 + S_{21}^2}{2S_{11}} \quad (11)$$

Delle soluzioni di (9) e di (10) viene selezionata quella in cui il coefficiente di trasmissione Γ e il fattore di propagazione P sono in modulo minori di uno, sotto l'ipotesi di passività.

Noto il fattore di propagazione P , segue la fase 115 di determinazione delle costanti di attenuazione α e di propagazione β , legate al fattore di propagazione P dalla relazione

$$P = P(\beta, \alpha) = e^{-j\gamma L_d} = e^{-\alpha L_d} e^{-j\beta L_d} \quad (12)$$

Pertanto, la costante di attenuazione α è calcolata in base a

$$\alpha = -\frac{\ln|P|}{L_d} \quad (13)$$

Mentre, la costante di propagazione β è data da

$$\beta = \beta_n = \beta_0 \pm \frac{2\pi n}{L_d} \quad (14)$$

in cui β_0 è la costante di propagazione di banda base ("baseband") e n è un numero intero.

Noti α e β_0 , ma non β data l'indeterminazione di n , si

procede alla fase 107 relativa al calcolo della permittività dielettrica relativa ε_r e della tangente di perdita $\tan\delta$ del campione 4. Infatti, ε_r e $\tan\delta$ sono legate ad α e β secondo le seguenti espressioni analitiche

$$\begin{cases} \beta = k_0 \sqrt{\varepsilon_r \Delta_d} \left[\sqrt{1 + \left(\frac{\tan\delta}{\Delta_d}\right)^2} \right] \cos\psi \\ \alpha = \beta \tan\psi \end{cases} \quad (15)$$

in cui $k_0 = \omega/c$ è la costante di propagazione in una guida d'onda vuota ($\omega = 2\pi f$ è la pulsazione e f la frequenza), Δ_d è il fattore di dispersione definito nell'equazione (6), mentre ψ è dato da

$$\psi = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{\tan\delta}{\Delta_d} \right) \quad (16)$$

Riscrivendo le due relazioni in (15) e inserendo anche l'equazione (14), si ottengono le seguenti relazioni che rappresentano le equazioni conclusive per risolvere il problema inverso completo

$$\begin{cases} \alpha^2 + \beta^2 = k_0^2 \varepsilon_r \Delta_d \sqrt{1 + \left(\frac{\tan\delta}{\Delta_d}\right)^2} = k_0^2 \varepsilon_r \Delta_d \sqrt{1 + (\tau)^2} \\ \beta = \alpha \frac{\sqrt{1 + \tau^2} + 1}{\tau} = \alpha \frac{\sqrt{1 + \left(\frac{\tan\delta}{\Delta_d}\right)^2} + 1}{\frac{\tan\delta}{\Delta_d}} \\ \beta = \beta_n = \beta_0 \pm \frac{2\pi n}{L_d} \end{cases} \quad (17)$$

in cui ε_r , $\tan\delta$ e n sono le incognite.

Uno dei possibili modi per risolvere le equazioni di (17) e quindi ottenere ε_r e $\tan\delta$ è quello di applicare un processo iterativo (fase 116), partendo ad esempio dalla

permettività dielettrica relativa ϵ_r e dalla tangente di perdita $\tan\delta$ calcolate risolvendo il problema inverso in forma approssimata e date dalle relazioni del sistema (8).

Una verifica sulle soluzioni ottenute al termine di ogni iterazione consiste nel confrontare il ritardo di gruppo ricavato sperimentalmente (vedere figura 10 ed equazione (1)) e quello ricavato analiticamente sulla base delle soluzioni ottenute dall'iterazione.

Il ritardo di gruppo sperimentale è calcolato come

$$\tau_{g1} = \tau_{g21} - \frac{\tau_{g11} + \tau_{g22}}{2}; \tau_{g2} = \tau_{g12} - \frac{\tau_{g11} + \tau_{g22}}{2} \quad (18)$$

Mentre il ritardo di gruppo analitico è dato da

$$\tau_g = \frac{L_d}{v_g} = \frac{L_d \omega \epsilon_r}{c^2 \beta} \frac{\left(1 + \frac{\alpha}{\beta} \tan\delta\right)}{\left(1 + \left(\frac{\alpha}{\beta}\right)^2\right)} \quad (19)$$

in cui v_g è la velocità di gruppo.

Se il ritardo di gruppo sperimentale e analitico sono uguali, a meno di una tolleranza, la costante dielettrica relativa ϵ_r e la tangente di perdita $\tan\delta$ calcolate sono accettabili. In caso contrario, risulta necessaria una successiva iterazione andando a variare n due volte, una unità in più ed una unità in meno, nella terza equazione del sistema (17), al termine della quale si ottengono due corrispondenti soluzioni per il ritardo di gruppo. Se tali soluzioni discordano maggiormente, si conclude che le soluzioni dell'iterazione precedente sono accettabili. In caso contrario, si procede con un'ulteriore iterazione

variando n fino a quando la verifica dei valori del ritardo di gruppo all'iterazione con $n+1$ e all'iterazione con $n-1$ risultano peggiori rispetto all'iterazione con n .

ESEMPI

1. Caso di prova per la validazione della caratterizzazione dielettrica del campione

Nel seguito viene riportato un caso di prova per la verifica e validazione della caratterizzazione dielettrica utilizzando il sistema di rilevazione di figura 1 e risolvendo il problema inverso sia in forma approssimata sia in forma completa per un campione 4 costituito da una soluzione tampone isotonica.

In base al noto modello di Debye dell'acqua a temperatura ambiente (vedi W. Ellison, "Permittivity of Pure Water, at Standard Atmospheric Pressure, over the Frequency Range 0-25 THz and the Temperature Range 0-100 °C," Journal of Physical and Chemical Reference Data Vol. 36. N. 1, 2007), è possibile preliminarmente ipotizzare l'intervallo di valori in cui la permittività dielettrica relativa ϵ_r e la tangente di perdita $\tan\delta$ della soluzione tampone isotonica misurata sarà compresa relativamente alla banda di frequenza nelle microonde tra 26 e 40 GHz. Specificatamente, la permittività dielettrica relativa ϵ_r della soluzione tampone isotonica misurata deve essere compresa tra 20 e 30, mentre la tangente di perdita $\tan\delta$ deve essere compresa tra 1.2 e

1.4.

Le figure 11 e 12 illustrano, rispettivamente, gli andamenti dei parametri di scattering in riflessione (S_{11}) e in trasmissione (S_{21}), acquisiti dal VNA 2. Le oscillazioni, maggiormente associate al parametro di scattering in riflessione, sono dovute alle discontinuità geometriche nel porta-campione, tra cui gli elementi di contenimento e le scanalature nella flangia di fissaggio. Le figure 11 e 12 mostrano dati grezzi (RawMeas) e dati filtrati (Win&Gated). Questi ultimi vengono filtrati attraverso una tecnica di time gating in una finestra temporale Δt di circa 0.7 ns, corrispondente a 10 volte la risoluzione temporale data dalla larghezza di banda pari a 14 GHz in una guida d'onda WR28 e una risoluzione spaziale $\Delta z = c \Delta t$ di circa 210 mm (dove c è la velocità della luce).

L'andamento della costante di attenuazione α , della costante di propagazione β e della costante di propagazione baseband β_0 è mostrato in figura 13. Si può notare come β_0 non coincide con β , bensì β è dato dalla terza equazione del sistema (17) con n pari a 1. Gli effetti dovuti alle discontinuità geometriche sono presenti anche nelle curve di figura 13.

Le figure 14 e 15 mostrano, rispettivamente, l'andamento della permittività relativa ϵ_r e della tangente di perdita $\tan\delta$, ottenute risolvendo il problema inverso in

forma approssimata. Si nota come i valori sia della permittività dielettrica relativa ϵ_r sia della tangente di perdita $\tan\delta$ non sono compresi negli intervalli ipotizzati secondo il modello di Debye. Tuttavia, entrambe le soluzioni vengono utilizzate come stime iniziali nel processo iterativo per risolvere il problema inverso completo. Le soluzioni, indicate nelle figure 16 e 17, hanno raggiunto la convergenza al termine della prima iterazione.

Prendendo in considerazione il ritardo di gruppo misurato e analitico, si è verificata la validità delle soluzioni ottenute con il modello completo (l'errore tra il ritardo di gruppo misurato e analitico è di circa il 70%). E' bene notare come i valori della permittività dielettrica relativa ϵ_r (figura 16) e della tangente di perdita $\tan\delta$ (figura 17) sono infatti compresi negli intervalli ipotizzati in base al modello di Debye.

Calcolando le lunghezze L_1 e L_2 delle due extra porzioni, si è ottenuto $L_1=0.2$ mm e $L_2=0.16$ mm, confermando così la non equivalenza tra lo spessore degli elementi di contenimento (pari a 0.05 mm) e le lunghezze L_1 e L_2 delle extra porzioni.

2. Esempio del metodo secondo l'invenzione

Viene qui riportato un esempio applicativo del metodo secondo la presente invenzione.

La soluzione di riferimento della prima misura 101

(indicata come "Tampone" in figura 18) è una soluzione tampone isotonica con aggiunta di 1% BSA (Bovine Serum Albumine) e 0,05% Sodio azide.

La soluzione della seconda misura 102 (indicata come "VLPs (4RF)" in figura 18) è data dalla soluzione di riferimento, come poco sopra specificata, alla quale viene aggiunta una specifica concentrazione di VLP del virus dell'HIV/SIV pari a 1000 particelle di VLP per μl di soluzione.

Il volume sia della soluzione "Tampone" della prima misura 101 sia della soluzione "VLPs (4RF)" della seconda misura 102 è pari a 76 μl .

La figura 18 mostra l'andamento della parte reale della permittività dielettrica relativa ϵ_r' sia per la soluzione "Tampone" sia per la soluzione "VLPs(4RF)" al variare delle frequenze calcolata mediante i procedimenti di elaborazione dei dati dettagliati precedentemente nel caso di prova. Nel dettaglio, le due curve di figura 18 mostrano il valor medio della permittività in funzione della frequenza e le barre di incertezza (deviazione standard) dovute all'errore di misura in una serie di circa 10 esperimenti consecutivi, per quanto riguarda sia la soluzione "Tampone" sia la soluzione "VLPs(4RF)". Si osserva come la curva relativa alla soluzione "VLPs(4RF)" mostri, in tutta l'ampiezza di banda, valori della permittività sostanzialmente superiori rispetto a

quelli relativi alla soluzione tampone. Tali differenze sono pertanto attribuibili alla presenza nella soluzione "VLPs(4RF)" di VLP.

Queste differenze sono maggiormente evidenziate in figura 19, la cui curva, propriamente detta contrasto, rappresenta la differenza tra i valori di permittività della soluzione "VLPs(4RF)" e quella tampone. Pertanto, la curva di figura 19 fornisce la caratterizzazione dielettrica della soluzione con VLP.

La curva di figura 19 mostra inoltre come esistano delle frequenze nella banda di lavoro 26-40 GHz alle quali il contrasto tra gli andamenti della permittività delle due soluzioni si massimizza; per esempio 28 GHz risulta essere una frequenza in cui maggiormente si riesce ad apprezzare la differenza nella parte reale della permittività dielettrica tra la soluzione tampone e la soluzione "VLP (4RF)".

La buona ripetibilità dei risultati è confermata dalle figure 20 e 21. I contrasti illustrati nelle figure 20 e 21 sono infatti ottenuti a partire da dati sperimentali raccolti durante differenti sessioni di esperimenti. Analogamente al contrasto di figura 19, entrambi i contrasti nelle figure 20 e 21 mostrano il picco massimo alla frequenza di 28 GHz.

Si è in pratica constatato come il metodo dell'invenzione raggiunga gli scopi preposti.

In particolare, il metodo dell'invenzione permette la

rilevazione di agenti virali tramite spettroscopia dielettrica nelle microonde senza la necessità di introdurre marcatori come nel caso delle tecniche basate su PCR.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la rilevazione di un agente virale comprendente le fasi di:

- a) disporre un primo campione comprendente una soluzione acquosa in una guida d'onda delimitata assialmente da una coppia di elementi di contenimento sostanzialmente trasparenti alle microonde e definenti rispettive interfacce del campione;
- b) trasmettere al primo campione un segnale a frequenza variabile in una banda prefissata nelle microonde;
- c) acquisire almeno un parametro dielettrico del primo campione al variare della frequenza tramite misure in trasmissione e riflessione,
- d) disporre nella guida d'onda un secondo campione;
- e) trasmettere il detto segnale al secondo campione;
- f) acquisire il corrispondente parametro dielettrico del secondo campione al variare della frequenza tramite misure in trasmissione e riflessione, e
- g) effettuare un'analisi spettroscopica differenziale su detti parametri per determinare la presenza di un agente virale in almeno uno di detti primo e secondo campione.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la banda è compresa tra 26 GHz e 40 GHz.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui le fasi c) ed f) comprendono la misura di parametri di

scattering in trasmissione e in riflessione.

4. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui le fasi b), c), e) ed f) sono realizzate mediante un analizzatore di rete vettoriale (2) comprendente almeno due porte collegate a rispettive porte della guida d'onda.

5. Metodo secondo la rivendicazione 3 o 4, in cui le fasi c) ed f) comprendono il calcolo di detti parametri dielettrici sulla base dei parametri di scattering misurati.

6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui il calcolo dei parametri dielettrici del primo e del secondo campione comprende la fase di determinare i parametri di scattering effettivi in riflessione (S_{ii} e S_{jj}) e in trasmissione (S_{ij} e S_{ji}) alle interfacce dei campioni a partire dai parametri di scattering in riflessione (s_{ii} , s_{jj}) e in trasmissione (s_{ij} e s_{ji}) misurati sulla base di un modello in cui gli elementi di contenimento sono rappresentati da porzioni vuote della guida d'onda.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui il calcolo dei parametri dielettrici comprende le fasi di:

- determinare un coefficiente di riflessione Γ alle interfacce del campione e un fattore di propagazione P del campione;
- determinare una costante di attenuazione e una costante di propagazione del campione;
- ricavare una permittività dielettrica relativa ϵ_r e

una tangente di perdita ($\tan\delta$) del campione.

8. Metodo secondo le rivendicazioni 6 e 7, in cui il calcolo dei parametri dielettrici comprende la fase di calcolare un'impedenza del campione assumendo un coefficiente di riflessione Γ alle interfacce del campione equivalente ai parametri di scattering effettivi in riflessione.

9. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui il primo campione è una soluzione tampone isotonica, preferibilmente un tampone fosfato salino.

10. Sistema per la rilevazione di un agente virale secondo il metodo di una delle rivendicazioni precedenti, comprendente un analizzatore di rete vettoriale (VNA) (2) provvisto di almeno due porte (P1, P2), un porta-campione (3) e due linee di trasmissione (5) che collegano le porte P1 e P2 del VNA (2) al porta-campione (3), in cui il porta-campione (3) è provvisto di una cavità (8) passante atta contenere un campione (4) da sottoporre a test e definente una guida d'onda (9) e comprende una coppia di elementi di contenimento (12) sostanzialmente trasparenti e delimitanti assialmente la cavità (8).

11. Sistema secondo la rivendicazione 10, in cui la guida d'onda (9) è a sezione rettangolare.

12. Sistema secondo la rivendicazione 10 o 11, in cui la guida d'onda (9) è di tipo WR28 operante in una banda di

frequenze compresa tra 26 GHz e 40GHz.

13. Sistema secondo una delle rivendicazioni da 10 a 12, in cui gli elementi di contenimento (12) comprendono film adesivi.

14. Sistema secondo una delle rivendicazioni da 10 a 13, in cui il porta-campione (3) comprende una flangia (10) perimetrale per il collegamento alle linee di trasmissione (5).

15. Sistema secondo la rivendicazione 14, in cui le linee di trasmissione (5) comprendono rispettivi cavi coassiali e rispettivi adattatori (13) cavo coassiale/guida d'onda.

16. Sistema secondo una delle rivendicazioni da 10 a 15, in cui la cavità (8) presenta una lunghezza assiale compresa tra 2 e 5 mm.

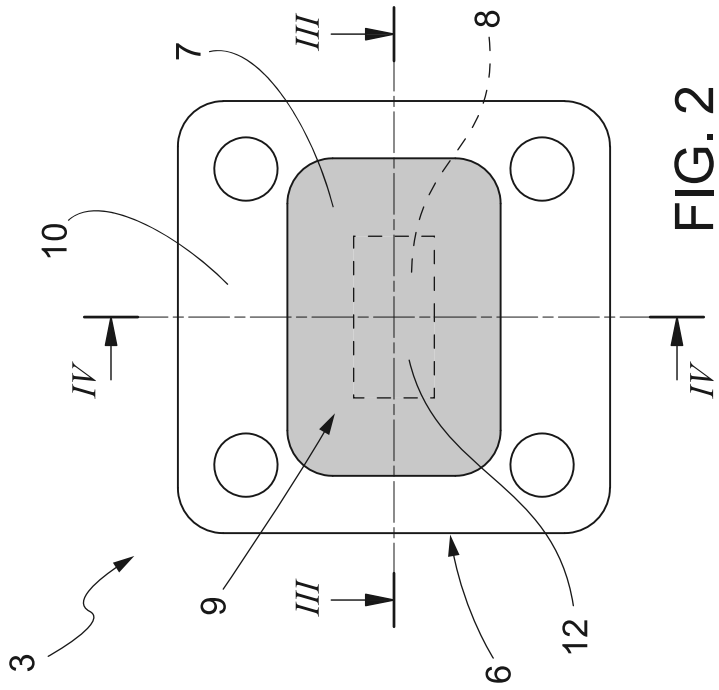


FIG. 2

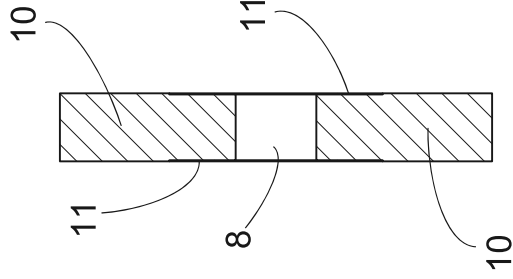


FIG. 4

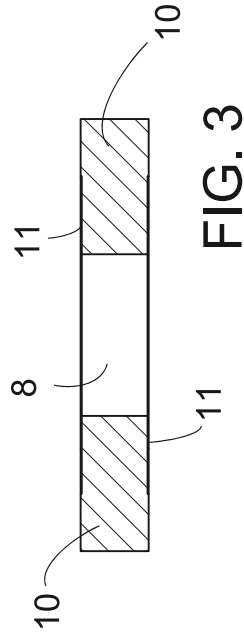


FIG. 3

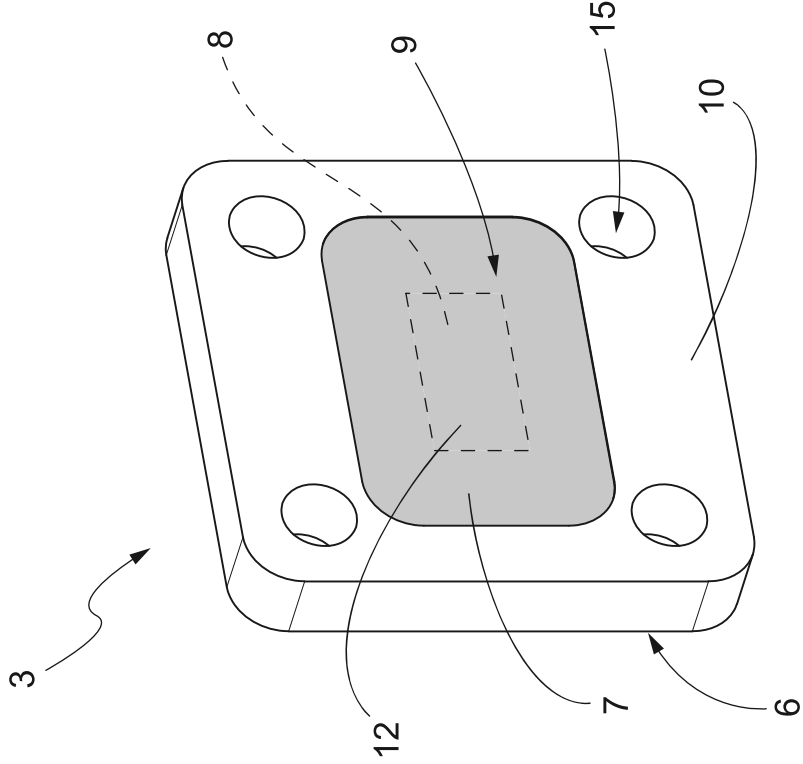


FIG. 5

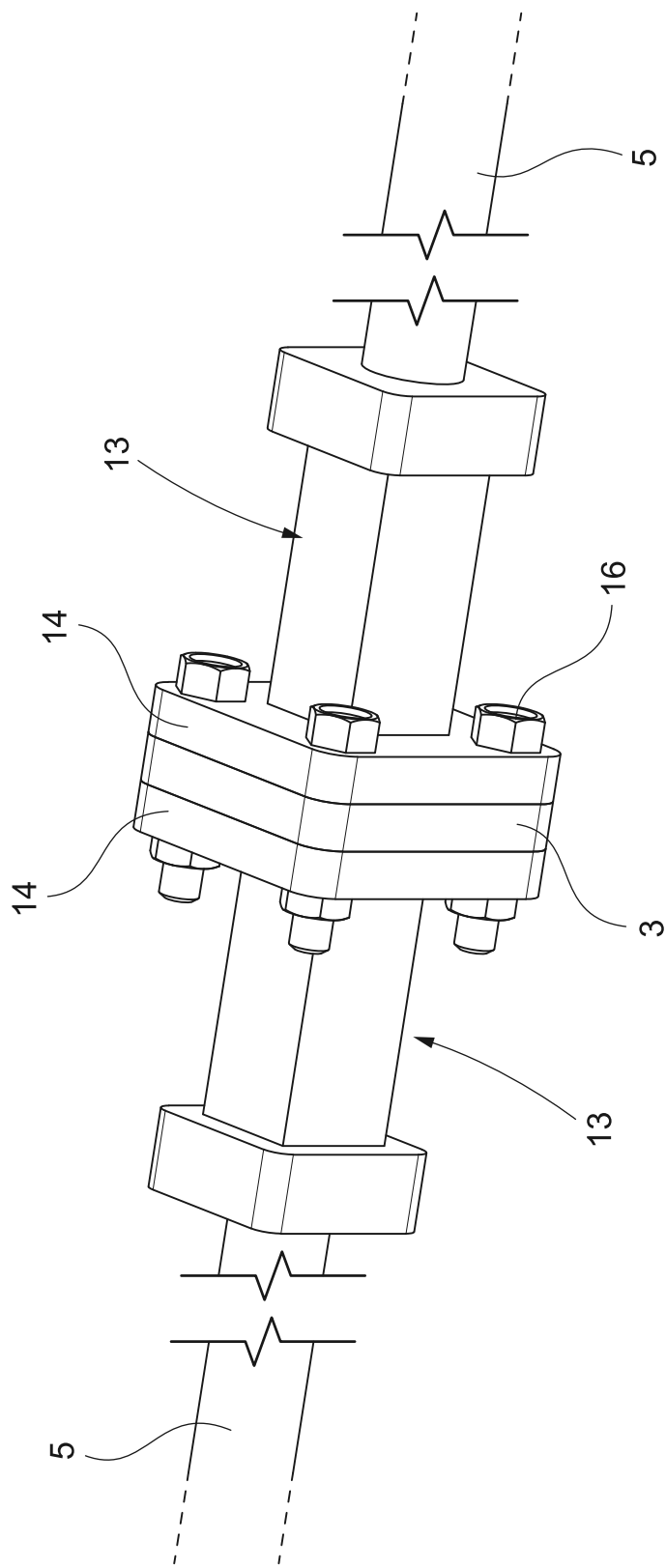


FIG. 6

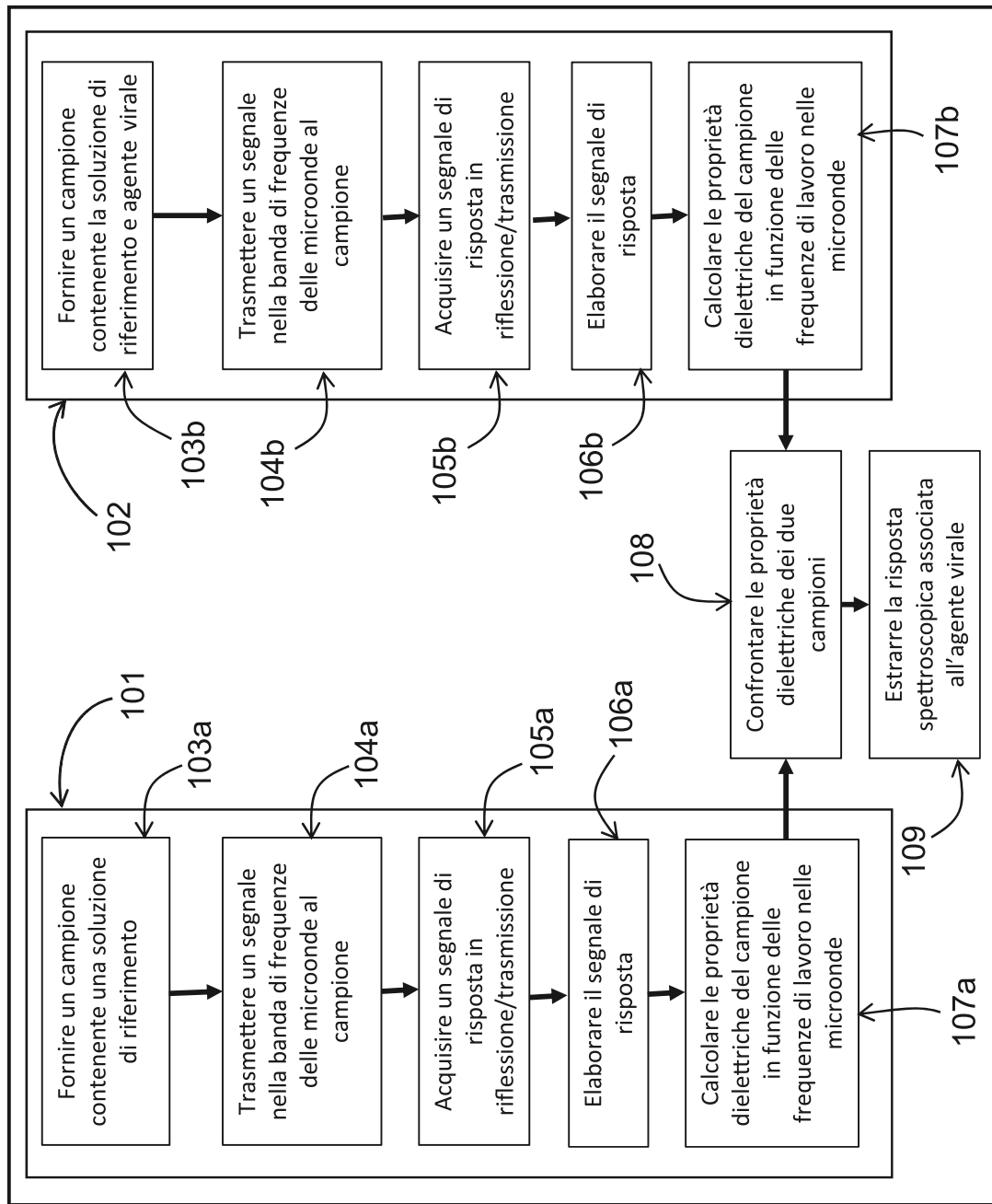


FIG. 7

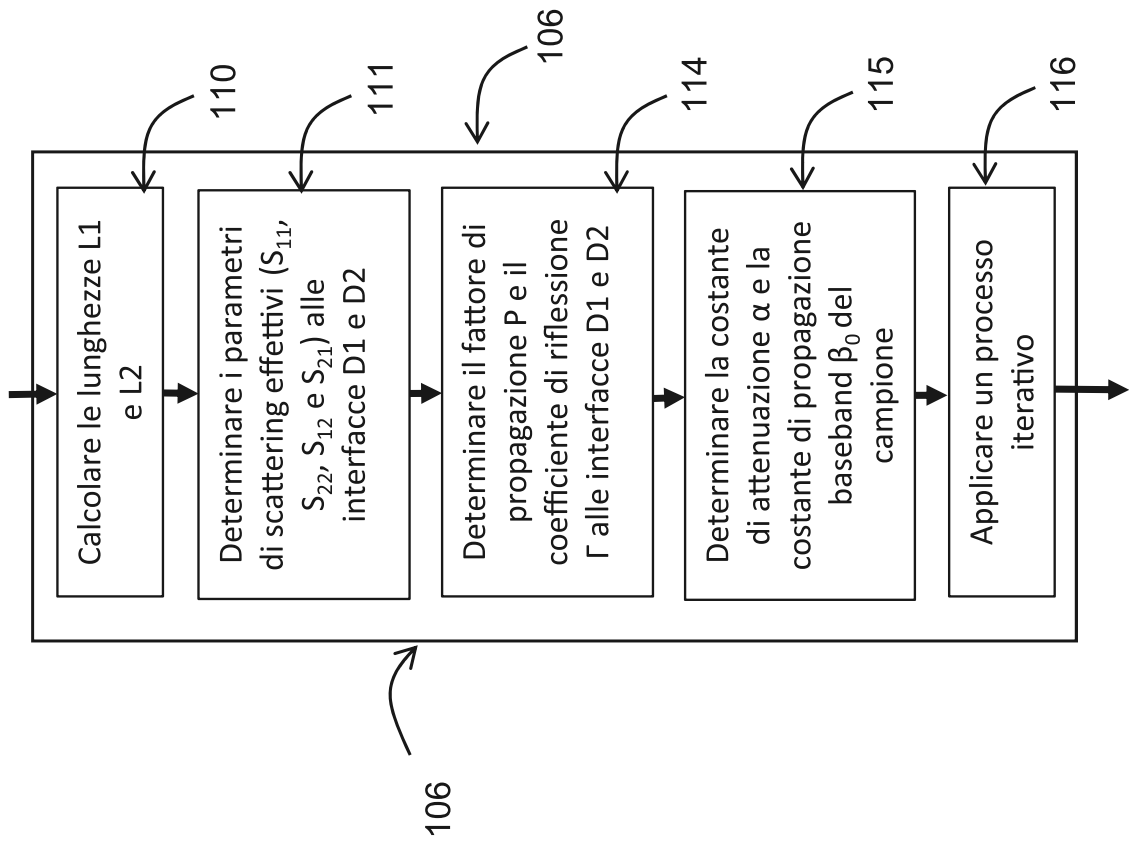


FIG. 9

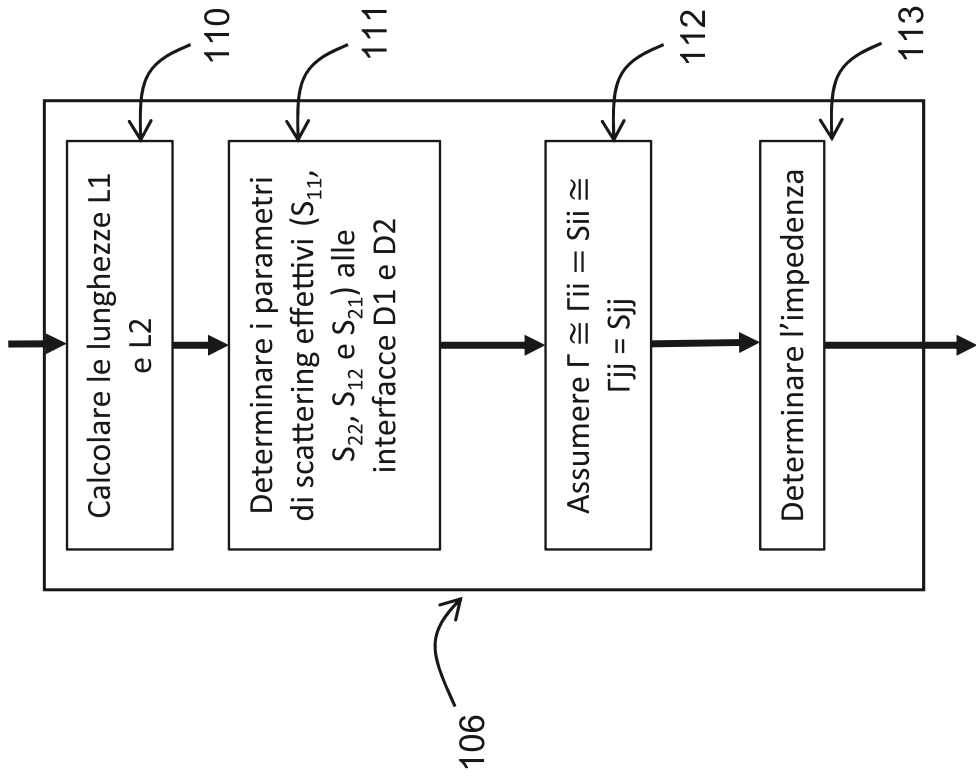


FIG. 8

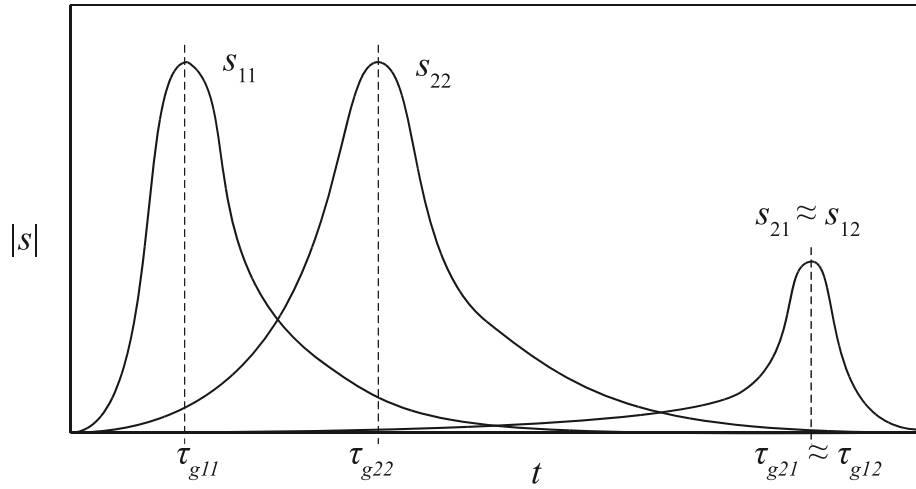


FIG. 10

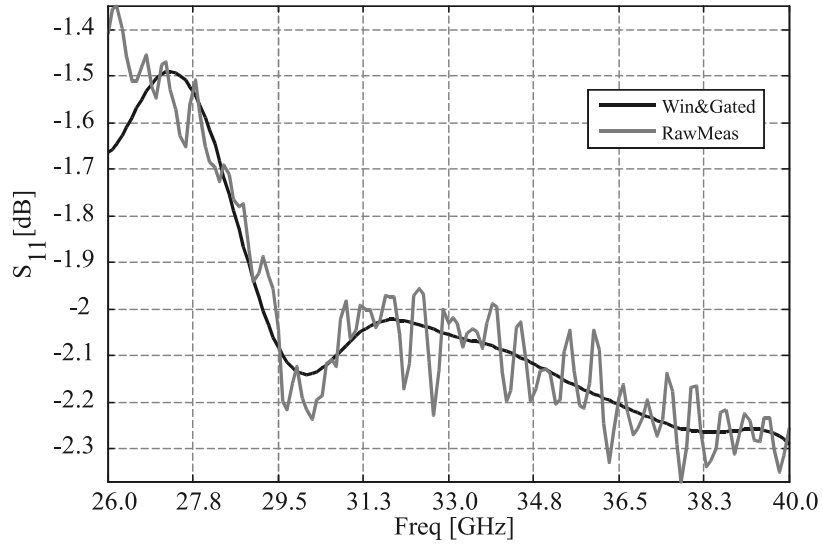


FIG. 11

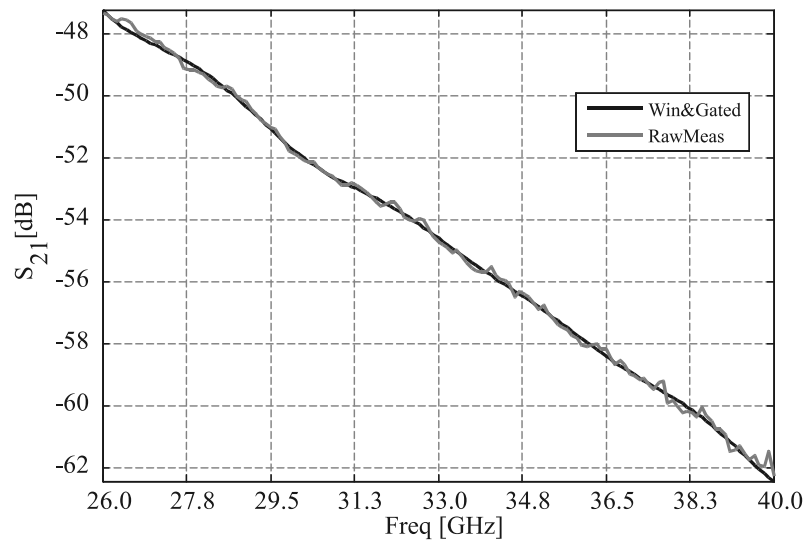


FIG. 12

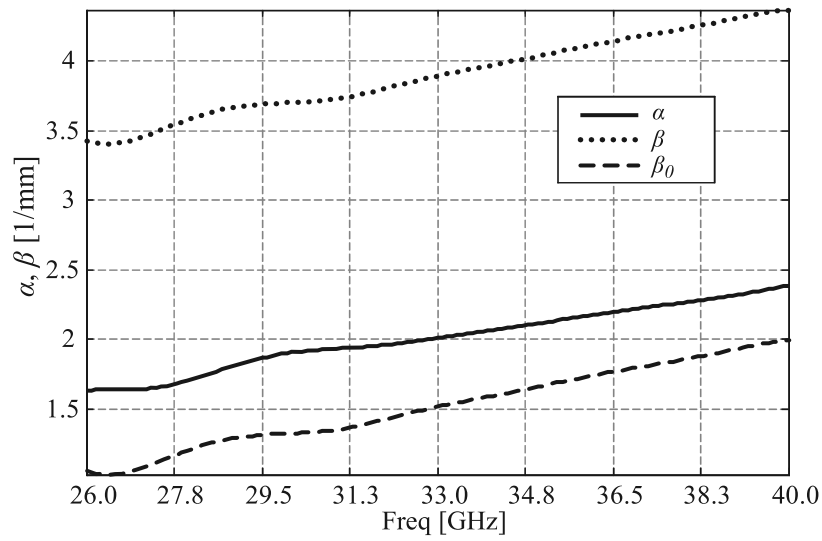


FIG. 13

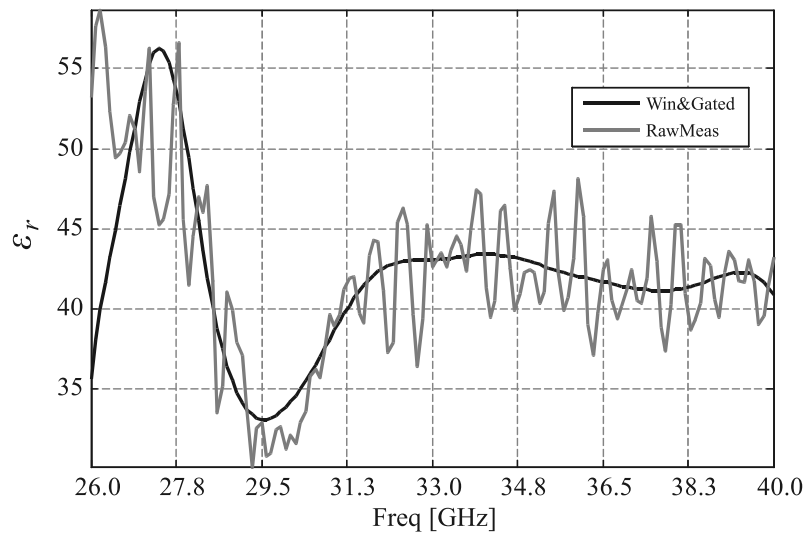


FIG. 14

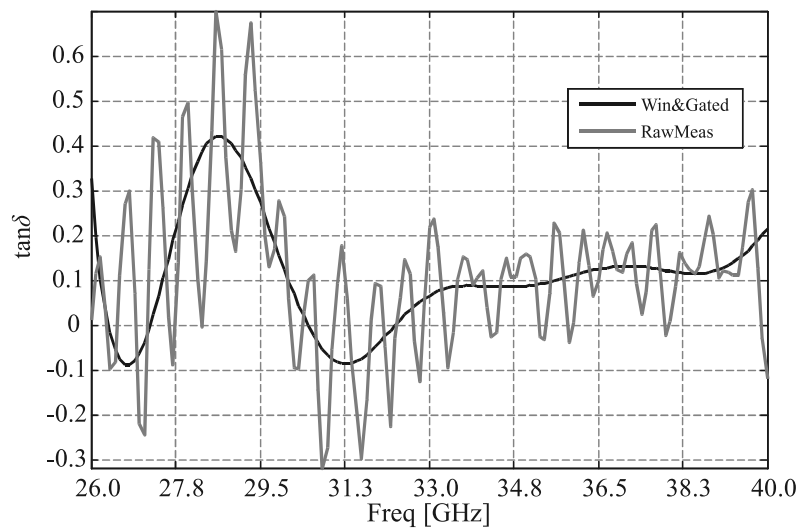


FIG. 15

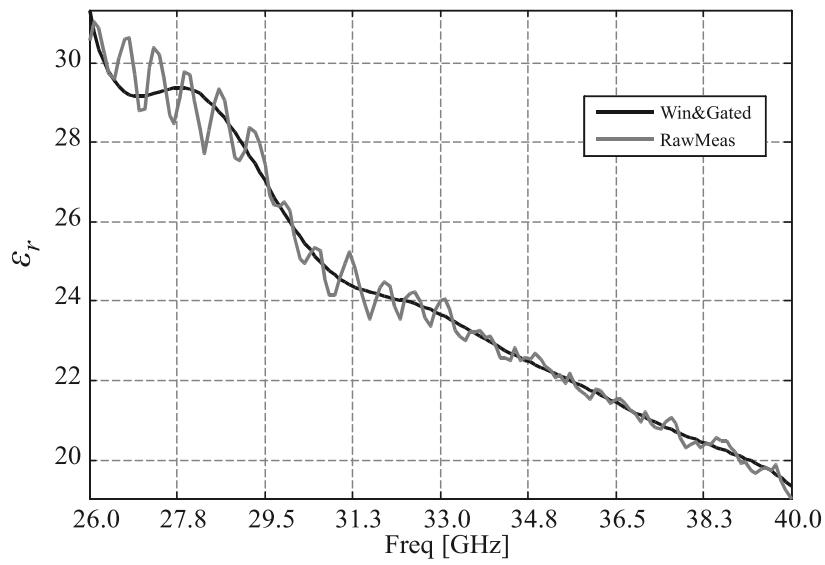


FIG. 16

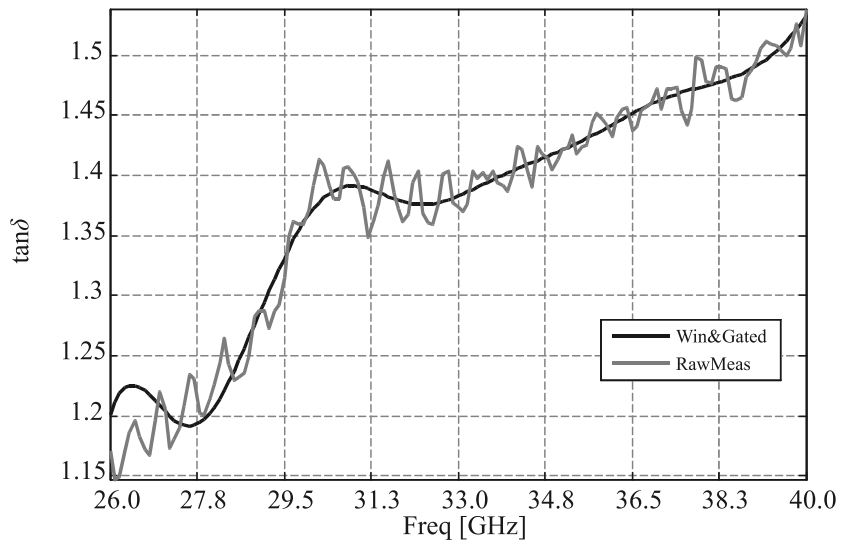


FIG. 17

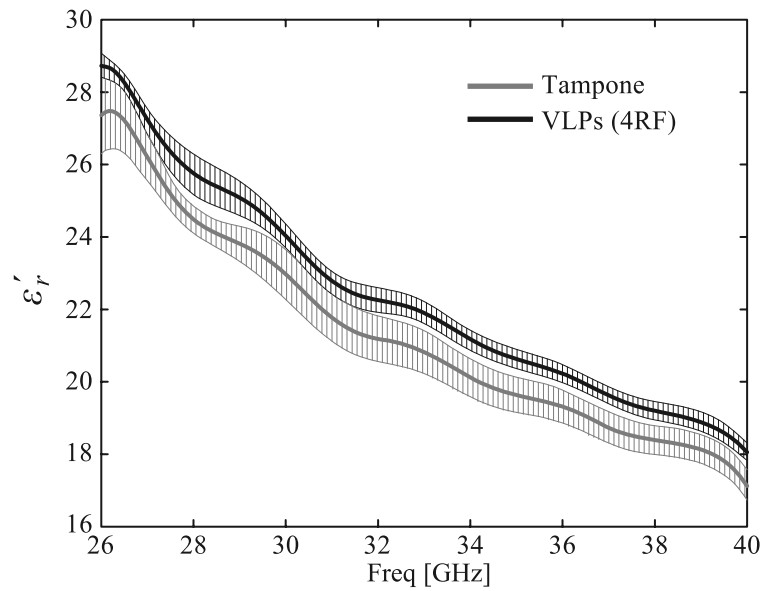


FIG. 18

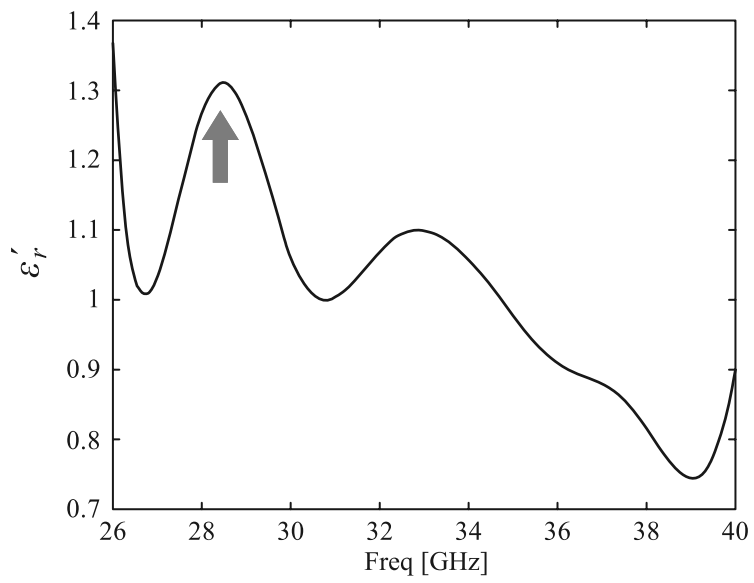


FIG. 19

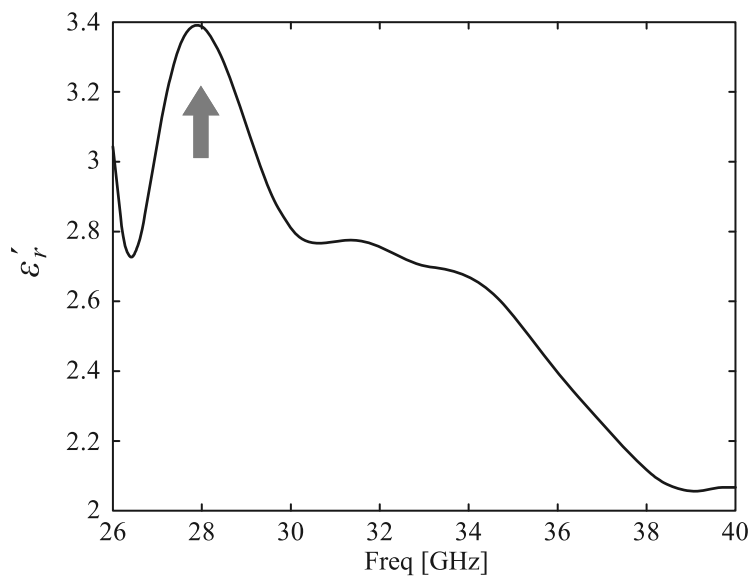


FIG. 20

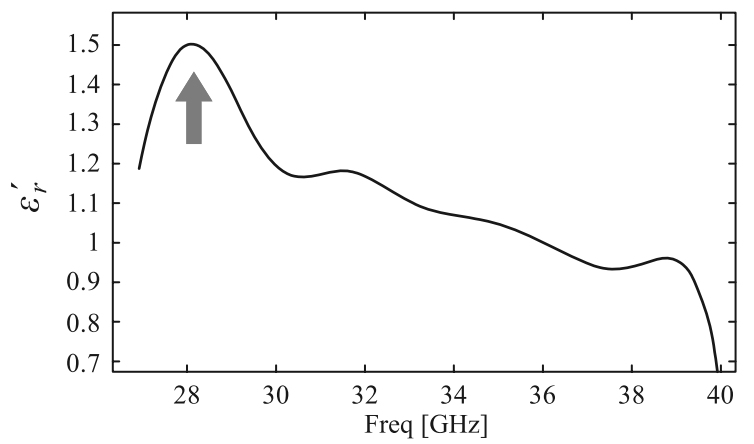


FIG. 21