



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00764**

(22) Data de depozit: **26/10/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2019** BOPI nr. **8/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2014 BOPI nr. **4/2014**

(73) Titular:

- **IVANA SIMONA**,
STR. ȘERBAN GHEORGHE NR. 93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **IODACHE PETRIȘOR ZAMORA**,
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 8, SC. 3,
ET. 2, AP. 99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **PÎRVU-DINU CRISTINA ELENA**,
STR. GHEORGHE LAZĂR NR. 10, ET. 1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **POPESCU NICOLAE ALEXANDRU**,
STR. GHEORGHE ȘERBAN NR. 93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **RUSU ELENA**, BD. OLTENIA NR. 1A,
BL. T1, SC. 4, AP. 12, CRAIOVA, DJ, RO;
- **NAUM NICOLAE**, STR. NOVACI NR. 2,
BL. S9, ET. 1, AP. 6, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **IVANA SIMONA**,
STR. ȘERBAN GHEORGHE NR. 93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **IODACHE PETRIȘOR ZAMORA**,
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 8, SC. 3,
ET. 2, AP. 99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **PÎRVU-DINU CRISTINA ELENA**,
STR. GHEORGHE LAZĂR NR. 10, ET. 1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

- **POPESCU NICOLAE ALEXANDRU**,
STR. GHEORGHE ȘERBAN NR. 93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **RUSU ELENA**, BD. OLTENIA NR. 1A,
BL. T1, SC. 4, AP. 12, CRAIOVA, DJ, RO;
- **NAUM NICOLAE**, STR. NOVACI NR. 2,
BL. S9, ET. 1, AP. 6, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

YU ZHAO, MINGQIANG YE, NENGQIN JIA, YU GE, HEBAI SHEN, "SIMULTANEOUS DETECTION OF MULTIFOOD-BORNE PATHOGENIC BASED ON FUNCTIONALIZED QUANTUM DOTS COUPLED WITH IMMUNOMAGNETIC SEPARATION IN FOOD SAMPLES", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, NR. 2, VOL. 57, PP. 517-524, 2009; WO 2010/078399 A2 YU ZHAO, MINGQIANG YE, NENGQIN JIA, YU GE, HEBAI SHEN, "SIMULTANEOUS DETECTION OF MULTIFOOD-BORNE PATHOGENIC BACTERIA BASED ON FUNCTIONALIZED QUANTUM DOTS COUPLED WITH IMMUNOMAGNETIC SEPARATION IN FOOD SAMPLES", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, NR. 2, VOL. 57, PP. 517-524, 2009; WO 2010/078399 A2

(54) **METODĂ ȘI DISPOZITIV PENTRU IDENTIFICAREA SIMULTANĂ A MICROORGANISMELOR DE TIP ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA SPP., LISTERIA MONOCYTOGENES, CAMPYLOBACTER SPP. DIN ALIMENTE**



RO 129397 B1

1 Invenția se referă la o metodă și la un dispozitiv pentru identificarea rapidă a unor
agenți biologici de tip *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* și
3 *Campylobacter spp.*, din alimente.

Sunt cunoscute diverse metode care urmăresc realizarea unei detecții rapide a
5 microorganismelor, concomitent cu identificarea agentului urmărit.

Din brevetul **RO 125797** se cunosc o metodă și un dispozitiv sondă fluorometrică
7 portabilă, de mici dimensiuni, destinată determinării valorii fluorescenței unei specii chimice
sau biologice, și convertirea acesteia în unități de concentrație, în care sonda este alcătuită
9 dintr-un corp în interiorul căruia sunt montate un canal de excitare, format dintr-un led cu
emisie în albastru, și un canal de măsurare a fluorescenței, așezat la un unghi de 90° față
11 de canalul de excitare, format, la rândul lui, dintr-o lentilă optică colectoare, un filtru de
interferență și un senzor de mare sensibilitate, și o unitate de interfațare.

De asemenea, din brevetul **RO 82768** se cunosc o metodă de analize fluorometrice
13 și aparatul utilizat folosit pentru determinarea cu precizie a concentrației substanțelor
fluorescente din soluții cu absorbanta ridicată, fiind alcătuit dintr-o sursă de radiații
15 monocromatice, o cuvă în care se află soluția substanței de analizat, prin care trece radiația
transmisă în conexiune cu un instrument indicator care indică valorile factorilor de conexiune
17 cu un instrument indicator care indică valorile factorilor de corecție și/sau absorbția
fluorescente emise.

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii prezintă următoarele dezavantaje: limitarea
21 tehnicii instrumentale în raport cu posibilitățile de scanare a structurii morfochimice și
funcționalității genetice ale microorganismelor; uzarea morală continuă a tehnicilor de
23 identificare actuale, din cauza modificărilor survenite la nivelul structurii genetice și
morfochimice; numărul mare de interferenți chimici și biochimici proveniți din mediul
25 monitorizat, care pot apărea în situații reale de detecție biologică, din cauza proprietăților
chimice și funcționalității lor chimice și biologice asemănătoare cu cele ale microorganismelor
27 țintă; limitarea modalităților de prelevare ale analiților biologici, datorate numărului mic de
microorganisme prezente în mediul monitorizat: acest impediment are ca rezultat limitarea
29 sensibilității, specificității și rapidității proceselor de detecție și de cuantificare; costuri
operaționale ridicate versus timp mare de răspuns și numărul redus de microorganisme
31 sensibilizate.

În pofida multor cercetări avansate în domeniul detecției biologice, problema
33 discriminării tipului și clasei de microorganisme oscilează în jurul tehnicilor deja elaborate,
fundamentate pe conceptele de recunoaștere imunologică, recunoaștere biochimică
35 specifică, metode optice (fluorescență). Astfel, microscopia optică oferă un număr redus de
informații, referitor la tipul de microorganisme prezent în mediul de analiză. Determinarea
37 clasei de apartenență a bacteriilor (Gram+, Gram-) este un test care prezintă dezavantajul
că determină numai clasa de bacterie prezentă în mediul de investigare. Aglutinarea și
39 inhibarea aglutinării este un test biochimic complex, caracteristic, dar care prezintă
dezavantajul că necesită un timp îndelungat și resurse financiare considerabile. Testele de
41 hidroliză, testul indolului, testul oxidazei, testele de oxidare, de degradare a aminoacizilor,
TSIA, ATP și reacția Kligler sunt teste specifice numai anumitor microorganisme, cu putere
43 de confirmare limitată, care se desfășoară în timp îndelungat și cu costuri ridicate.
Cromatografia în strat subțire, testele de imunofluorescență (directă, indirectă și
45 complementară), testele de imuno-adsorbție enzimatică (directă, indirectă, competitive),
IAHA, CF (complement fixation), neutralizare virală și Western Blot sunt teste antigen-
47 anticorp cu înaltă specificitate, dar care necesită proceduri speciale de condiționare a pro-
belor, timp mare de confirmare și costuri ridicate. Testele de tip RBIA (real time biospecific

RO 129397 B1

interaction analysis) și LAPS (light addressable potentiometric sensor) sunt teste cu specificitate limitată, dependente puternic de mediul de analiză; de altfel, aceste teste sunt teste în curs de fundamentare. PCR (polymerase chain reaction) este o tehnică având grad înalt de sensibilizare și confirmare biologică, nesustenabilă din punct de vedere economic, și neimplementabilă în fluxuri tehnologice. GC-MS (gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă) este o tehnică ce poate confirma virusurile și toxinele bacteriene, nesustenabilă din punct de vedere economic, și neimplementabilă în fluxuri tehnologice. Majoritatea metodelor biochimice prezintă dezavantajul că utilizează fluorocromi de marcă pentru recunoașterea microorganismelor țintă, putând induce evenimente false de sensibilizare, ca urmare a dispersiei moleculelor de fluorocrom în structuri moleculare diferite de analiții țintă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în identificarea rapidă și simultană a *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter* din probe de alimente.

Metoda de identificare simultană a microorganismelor de tip *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* din alimente, conform invenției, constă în aceea că probele alimentare se dezintegrează mecanic pentru a favoriza eliberarea microorganismelor de interes, apoi are loc marcarea biochimică, prin injectare controlată de nanoparticule de Fe_3O_4 , funcționalizate cu anticorpi specifici microorganismelor țintă, pentru a permite reticularea nanoparticulelor cu microorganismele prezente în proba de investigat, după care nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi se separă magnetic de microorganismele țintă, iar acestea din urmă se excită cu o sursă luminoasă, și se cuantifică fluorescența luând ca referință lungimile de undă din spectrul de fluorescență caracteristic fiecărui microorganism, iar detecția microorganismelor țintă urmează colectarea directă a particulelor de magnetită prin imunoseparare magnetică, fără a necesita procese intermediare de condiționare și prelucrare biochimică.

Dispozitivul pentru aplicarea metodei este format dintr-un sistem de monitorizare a unui flux de probe, un micromodul constituit dintr-un microsistem de prelevare și condiționare, un microsistem de poziționare a probelor, un micromodul de marcă biochimică ce injectează controlat în nanoparticule funcționalizate cu anticorpi specifici, în vederea reticulării specifice a hazardurilor țintă, un micromodul de separare magnetică, prevăzut cu o microsondă magnetică automatizabilă, care separă în mod controlat hazardurile marcate biochimic cu anticorpi, un micromodul de detecție care integrează o interfață optică destinată scanării microsondei magnetice încărcată cu microorganismele reticulate, o diodă laser, precum și un detector adecvat, un micromodul de comandă și control, care integrează o interfață electronică destinată amplificării semnalelor de detecție achiziționate, identificarea microorganismelor țintă prin compararea intensităților de fluorescență afișate pe o interfață grafică, cu cele dintr-o bază de date vectorizată, destinată automatizării, controlului și configurării parametrilor de detecție ai echipamentelor periferice ale dispozitivului.

Metoda elimină dezavantajele soluțiilor cunoscute prin aceea că în cuantificarea fluorescenței se iau ca referință lungimile de undă din spectrul de fluorescență caracteristic al fiecărui microorganism urmărit; de asemenea, prin stabilirea unei relații univoce între fluorescența aminoacizilor naturali ai microorganismele țintă și tipul microorganismele care au generat-o, fluorescența specifică fiind direct proporțională cu tipul și concentrația aminoacizilor excitați, spectrul de fluorescență caracteristic fiecărui microorganism identificat fiind obținut prin excitarea cu o sursă luminoasă a unei probe de aliment condiționată cu nanoparticule paramagnetice de Fe_3O_4 funcționalizate specific, colectate direct prin imunoseparare magnetică, fără a necesita procese intermediare de condiționare și prelucrare

RO 129397 B1

1 biochimică, în care nanoparticulele paramagnetice de Fe_3O_4 sunt acoperite cu un strat
organosilanic cu funcționalitate aminată, pentru prevenirea proceselor de degradare chimică
3 și de aglomerare micromagnetică, după care, ulterior, acestea sunt funcționalizate în mediu
bazic cu glutaraldehidă, proteină A sau anticorpii specifici *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*,
5 *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter*.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- 7 - pot fi detectate, identificate și monitorizate simultan mai multe tipuri de
microorganisme țintă, fără a compromite precizia și timpul de răspuns;
- 9 - detecția are loc fără a marca fluorocromic anticorpii specifici sau nanoparticulele
funcționalizate;
- 11 - sistemul de detecție este automatizat;
- elimină etapele intermediare de condiționare a probelor;
- 13 - este îmbunătățită precizia identificării microorganismelor prin limitarea apariției
evenimentelor false de detecție, datorate difuziei fluorocromilor de marcare;
- 15 - dispozitivul permite monitorizarea continuă a probelor de analiți din fluxul de
alimente monitorizat;
- 17 - dispozitivul prezintă o structură unitară, multimodulară, este portabil și poate fi
integrat flexibil în aplicații de detecție a hazardurilor, direct în fluxul de fabricare a alimentelor
19 (preparare, ambalare etc.).

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...5, care
21 reprezintă:

- fig. 1, principiul și succesiunea proceselor de funcționalizare, a nanoparticulelor
23 paramagnetice de magnetită (Fe_3O_4):

- 25 1 - acoperirea Fe_3O_4 cu organosilan;
- 26 2 - funcționalizarea Fe_3O_4 cu glutaraldehidă (GL) sau proteină A;
- 27 3 - reticularea complexului Fe_3O_4 + glutaraldehidă (GL) sau proteină A cu Ac
specifici microorganismelor țintă;
- 28 4 - reticularea biochimică, formarea unor clustere alcătuite din particule
29 funcționalizate Fe_3O_4 - GL + Ac specifici microorganismelor țintă;

- fig. 2, principiul metodei și structura softului de identificare biochimică vectorizată
31 (orientată):

- 33 1 - spectrele de fluorescență specifică a microorganismelor țintă *S. Aureus*
(a) și *E. Coli* (b) (bază de date);
- 34 2 - spectrul real achiziționat prin filtrare;
- 35 3 - sursă de lumină;
- 36 4 - sistem de dispersie al radiației de scanare;
- 37 5 - sistem de filtrare;
- 38 6 - detector;
- 39 7 - microactuator de comandă și control al poziției sistemului de dispersie
(selector automat al lungimii de undă);

- fig. 3, schema dispozitivului conform invenției:

- 41 1 - flux de probe;
- 42 2 - aliment;
- 43 3 - microsistem de prelevare și condiționare;
- 44 4 - microsistem de poziționare a probelor;
- 45 5 - microinjector de marcare biochimică;
- 46 6 - microsondă magnetică;
- 47 7 - inductor magnetic;

RO 129397 B1

8 - diodă laser;	1
9 - detector;	
10 - interfață electronică;	3
11 - interfață grafică;	
12 - interfață optică izolată;	5
- fig. 4, etapele metodei în cadrul dispozitivului;	
- fig. 5, spectrul de fluorescență specifică, achiziționat pe nanoparticule de Fe ₃ O ₄ reticulate pe <i>Staphylococcus aureus</i> și <i>Escherichia coli</i> .	7
Metoda conform invenției implică următoarele echipamente de analiză:	9
- pentru excitație a fost folosită o sursă DT-MINI-2-GS-OceanOptics, cuplată în configurație de fluorescență cu doi fotomultiplicatori PMC-100-3, pentru a obține spectrele de fluorescență specifică;	11
- datele de proces au fost colectate utilizând o placă de achiziție ultrarapidă P7888-FAST ComTec, cu patru canale de achiziție, în configurație 'time difference';	13
- spectrul de fluorescență a fost achiziționat pentru acele procese de fluorescență specifică cu timpul de viață de mai mic de 4095 ns;	15
- mediul software de detecție, identificare, monitorizare, automatizare, comandă și control a fost LabView.	17
Metoda pentru identificarea microorganismului, conform invenției, cuprinde parcurgerea următoarelor etape (algoritm):	19
- spectrul de fluorescență achiziționat este prelucrat software, astfel încât să poată fi diferențiate toate maximele de fluorescență;	21
- pentru fiecare maxim de fluorescență identificat, se identifică în baza de date de referință acele valori care se învecinează cu valoarea achiziționată, într-un interval mai mic decât $\delta\lambda_i$ ($\delta\lambda$ este precizia determinării);	23
- pentru fiecare valoare învecinată cu lungimea de undă achiziționată se calculează contribuția restului microorganismelor din baza de date la spectrul de fluorescență achiziționat în punctul λ_i (pentru a corecta și determina contribuția cu ponderile cele mai mari);	25
- se aduc corecțiile de fluorescență datorate anticorpilor de marcă biochimică utilizați (în vederea îndepărtării contribuției acestora);	27
- în cazul identificării unor lungimi de undă care conțin contribuții semnificative ale microorganismelor țintă, în acord cu baza de date se vor identifica vectorizat microorganismele care le-au generat;	29
- se trasează matrice de referință de identificare pentru fiecare microorganism țintă din alimente (fig. 3), în funcție de spectrele de fluorescență specifică.	31
Același tip de investigații și măsurători se efectuează și în cazul anticorpilor specifici reticulați pe suprafața nanoparticulelor de magnetită, pentru determinarea contribuției fluorescenței lor specifice la spectrul de fluorescență total al microorganismelor reticulate.	33
Microorganismele și nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi sunt analizate atât separat, cât și dopate în mod controlat în structura alimentelor, pentru determinarea, evaluarea și cuantificarea proceselor de separare imunomagnetică.	35
Prelevarea hazardurilor din probele de alimente este realizată utilizând nanoparticule de Fe ₃ O ₄ funcționalizate cu anticorpi specifici microorganismelor țintă, și conferă astfel o specificitate înaltă proceselor de identificare a microorganismelor vizate. De asemenea, prin utilizarea nanoparticulelor de Fe ₃ O ₄ , ca suport purtător pentru anticorpii specifici de recunoaștere a microorganismelor, conferă în plus o eficiență ridicată proceselor de imunoseparare magnetică, asigurând colectarea rapidă a unui număr semnificativ de	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 129397 B1

1 microorganismele, în vederea detecției și identificării lor. În vederea reticulării specifice a
microorganismelor țintă din alimente, nanoparticulele de Fe_3O_4 sunt acoperite în prealabil cu
3 un strat organosilanic cu funcționalitate aminată, astfel încât să prevină procesele de
degradare chimică și procesele de aglomerare micromagnetică induse de nanoparticulele
5 de Fe_3O_4 ; de asemenea, stratul organosilanic are rolul de a favoriza reticularea stabilă a
nanoparticulelor și a anticorpilor de reticulare specifică, precum și de a favoriza
7 funcționalizarea ulterioară a Fe_3O_4 cu proteina A. Funcționalizarea nanoparticulelor cu
anticorpi este realizată direct în mediu bazic, la pH de 11...12. Nanoparticulele funcțio-
9 nalizate cu anticorpi specifici, utilizate în procesul de marcarea biochimică, se prezintă sub
formă de suspensie, având o concentrație de 10 $\mu\text{g/mL}$.

11 Detecția simultană a mai multe microorganismele diferite, din proba investigată,
presupune cuantificarea spectrului de fluorescență achiziționat, în vederea determinării
13 intensităților emisiilor de fluorescență (la $\lambda_1... \lambda_n$), și compararea lor ulterioară cu valorile
înregistrate în bazele de date cu valori de referință ale intensităților de fluorescență emise
15 de fiecare microorganism vizat (fig. 3). Semnalul total de fluorescență achiziționat la o
anumită lungime de undă este suma semnalelor de fluorescență provenite de la toate tipurile
17 de microorganismele prezente în probă (fig. 3), depinzând de concentrație și de tipul acestora:

$$I_f = v_i \sum I_{\lambda_i}$$

19 unde:

I_f este semnalul de fluorescență total înregistrat;

21 v_i este contribuția emisiei de fluorescență caracteristice microorganismului țintă i ;

I_{λ_i} este intensitatea maximă de emisie de fluorescență a microorganismului țintă i .

23 Intensitatea de fluorescență înregistrată la lungimile de undă de referință $\lambda_1... \lambda_n$ este
rezultatul contribuției tuturor aminoacizilor naturali excitați de radiația de scanare, aflați pe
25 suprafața microorganismelor țintă și în profunzimea microorganismului scanat. Intensitatea
de fluorescență prezintă valori distincte pentru fiecare tip de microorganism, constituind o
27 amprentă caracteristică microorganismului care a generat fluorescența. Pentru realizarea de
baze de date de referință, pentru fiecare tip de microorganism vizat, se înregistrează valorile
29 intensității fluorescenței specifice la $\lambda_1... \lambda_n$, atât în stare nativă, separat pentru fiecare
microorganism, cât și în stare reticulată cu anticorpi, separat pentru fiecare microorganism.
31 Valorile înregistrate se implementează software la nivelul sistemului de detecție și identificare
a microorganismelor din alimente, sub formă de bază de date vectorizată programabilă; baza
33 de date vectorizată este constituită dintr-o matrice $m \times n$ (m : numărul de microorganismele
conținut în bază; n : lungimile de undă de referință), care conține ordonat intensitățile de
35 fluorescență ale fiecărui microorganism, la lungimile de undă de referință (fig. 2).

37 Matricele de identificare a bacteriilor din alimente fac parte integrantă din structura
software-ului de detecție, identificare și monitorizare a sistemului propus.

39 Conform invenției, dispozitivul de detecție în timp real a microorganismelor din
alimente integrează cinci module, fiecare dintre acestea îndeplinind funcții diferite în
41 ansamblul sistemului (fig. 3): un micromodul de prelevare a probelor (MP), care prelevează
și condiționează direct probele de alimente, în vederea marcării biochimice; un micromodul
43 de marcarea biochimică (MM), ce injectează controlat în MP nanoparticule funcționalizate cu
anticorpi specifici, în vederea reticulării specifice a microorganismelor țintă; un micromodul
45 de separare magnetică (MsM), ce integrează o microsondă magnetică, automatizabilă,
destinată separării controlate a hazardurilor marcate cu anticorpi; un micromodul de detecție
47 (OiD) care integrează o interfață optică, concepută pentru a integra și scana microsonda
magnetică, încărcată cu microorganismele marcate biochimic; un micromodul de comandă și
control (MCC), care integrează două interfețe care integrează electronica necesară pentru

RO 129397 B1

amplificarea semnalelor de detecție achiziționate, precum și pentru realizarea interfețelor electronice necesare automatizării și controlului (EI); și o interfață care integrează echipamentele periferice necesare (GI: HMI, convertori) configurării parametrilor de detecție, automatizare și control al dispozitivului. 1 3

Prin construcția sa, micromodulul MP de prelevare efectuează prelevarea de probe din diverse tipuri de alimente (carne, produse de panificație, lapte, ouă, preparate), fără a necesita prepararea sau condiționarea lor ante- sau postprelevare. Acesta conține o serie de elemente mecanice și electromecanice, care asigură prelevarea și dezintegrarea mecanică a probelor prelevate, astfel încât să fie favorizată eliberarea și reticularea bacteriilor de interes prezente în alimente. După finalizarea procesului de dezintegrare (~1...2 min), microsistemul **4** (fig. 3) poziționează automat microinjectorul **5** de marcă biochimică, ce injectează suspensia de nanoparticule funcționalizate cu anticorpi specifici. Alimentele dezintegrate mecanic rămân în contact cu nanoparticulele funcționalizate timp de câteva minute (~1...2 min), astfel încât să poată fi efectuată reticularea eficientă a microorganismelor prezente în proba de investigat. După finalizarea procesului de marcă biochimică, microsistemul **3** de prelevare este poziționat automat, astfel încât microsonda magnetică **6** să poată separa atât nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi, cât și nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi, dar reticulate stabil pe suprafața microorganismelor țintă. Procesul de separare magnetică durează maximum 1 min, iar intensitatea câmpului magnetic este ajustată astfel încât procesele de separare să aibă loc rapid și eficient. Microsonda magnetică **6** încărcată cu microorganisme țintă este poziționată automat în interiorul unei interfețe optice izolate **12** ce asigură scanarea suprafeței sondei. Semnalele generate la nivelul interfeței optice sunt transferate ulterior către interfața electronică **10** a micromodulului MCC, în vederea amplificării, prelucrării și transformării lor în informații utile de proces. Informațiile de proces vor fi afișate la nivelul interfeței grafice **11** sub formă de rapoarte de proces, astfel încât factorii de decizie să poată reacționa în timp util. Tot la nivelul interfeței grafice **11** pot fi stabilite procesele de configurare a parametrilor de detecție, în funcție de necesitățile și specificul fiecărui proces. Micromodulul de prelevare a probelor (MP) integrează o microcameră și un microsistem **3** de prelevare și condiționare retractabil, cu ajutorul căruia sunt prelevate probele de alimente **2**, automat și independent de natura alimentului, având funcție de extracție și dezintegrare a probelor. Procesul de dezintegrare a probelor are loc imediat după introducerea lor în camera de prelevare prevăzută cu un microsistem **4** de poziționare a probelor prelevate, în pozițiile corespunzătoare diferitelor faze ale procesului de detecție. Micromodulul de marcă biochimică (MM) integrează un microinjector **5** de marcă biochimică, acționat de un actuator liniar, astfel încât în microcamera de prelevare să poată fi injectată o cantitate bine determinată de nanoparticule funcționalizate cu anticorpii microorganismelor țintă. Micromodulul de separare magnetică (MsM) integrează o microsondă magnetică **6**, dotată cu un ac magnetizabil de prelevare. Microsonda **6** și bobina de inducție sunt asamblate pe suportul unui actuatorului liniar astfel încât capătul de prelevare magnetică să poată fi introdus în mod controlat în microcamera probelor. La rândul lor, microsonda **6** magnetică, bobina de magnetizare și actuatorul liniar sunt poziționate pe suportul unui microactuator rotativ, ce poziționează microsonda încărcată cu analiții prelevați în interiorul interfeței optice de scanare. Curentul din bobina de inducție este controlat de software-ul de automatizare, astfel încât intensitatea câmpului magnetic de separare este suficient de mare pentru separarea rapidă și eficientă a analiților biochimici reticulați de nanoparticulele purtătoare de dipol magnetic. 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45

RO 129397 B1

1 La $\lambda = 290$ nm aminoacizii naturali absorb radiația cu randamente de excitație diferite,
spectrul de fluorescență având randamente de emisie caracteristice fiecărui aminoacid.
3 Pentru a putea obține semnale analitice de calitate și o sensibilitate acceptabilă, în structura
dispozitivului OiD, conform invenției, este introdus un sistem de filtrare (prismă, filtre low-pas)
5 a radiațiilor detectate de fotomultiplicatorul din fig. 2, astfel încât să poată fi selectate cu
ușurință lungimile de undă de referință, și să fie evitate procesele de interferență induse de
7 radiația de fond.

Dispozitivul, conform invenției are următoarele caracteristici de performanță:

- 9 - timp de prelevare: maximum 5 min;
- timp de detecție: maximum 4 min;
- 11 - timp de identificare: maximum 3 min;
- greutate: maximum 25 kg;
- 13 - automatizare, comandă, control.

RO 129397 B1

Revendicări

1. Metodă de identificare simultană a microorganismelor de tip *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* din alimente, **caracterizată prin aceea că** probele alimentare se dezintegrează mecanic pentru a favoriza eliberarea microorganismelor de interes, apoi are loc marcarea biochimică, prin injectare controlată de nanoparticule de Fe_3O_4 , funcționalizate cu anticorpi specifici microorganismelor țintă, pentru a permite reticularea nanoparticulelor cu microorganismele prezente în proba de investigat, după care nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi se separă magnetic de microorganismele țintă, iar acestea din urmă se excită cu o sursă luminoasă, și se cuantifică fluorescența luând ca referință lungimile de undă din spectrul de fluorescență caracteristic fiecărui microorganism, iar detecția microorganismelor țintă urmează colectarea directă a particulelor de magnetită prin imunoseparare magnetică, fără a necesita procese intermediare de condiționare și prelucrare biochimică. 1
2. Dispozitiv pentru aplicarea metodei definite la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este format dintr-un sistem (3) de monitorizare a unui flux (1) de probe (2), un micromodul (MP) constituit dintr-un microsistem (4) de prelevare și condiționare, un microsistem (5) de poziționare a probelor, un micromodul de marcarea biochimică (MM), ce injectează controlat în micromodul (MP) nanoparticule funcționalizate cu anticorpi specifici (6), în vederea reticulării specifice a hazardurilor țintă, un micromodul (MsM) de separare magnetică, prevăzut cu o microsondă magnetică automatizabilă (7), care separă în mod controlat hazardurile marcate biochimic cu anticorpi, un micromodul de detecție (Oid), care integrează o interfață optică (13), destinată scanării microsondei magnetice încărcată cu microorganismele reticulate (7), o diodă laser (9), precum și un detector adecvat (10), un micromodul (MCC) de comandă și control, care integrează o interfață electronică (11; EI), destinată amplificării semnalelor de detecție achiziționate, identificarea microorganismelor țintă prin compararea intensităților de fluorescență afișate pe o interfață grafică (12; GI), cu cele dintr-o bază de date vectorizată, destinată automatizării, controlului și configurării parametrilor de detecție ai echipamentelor periferice ale dispozitivului. 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29

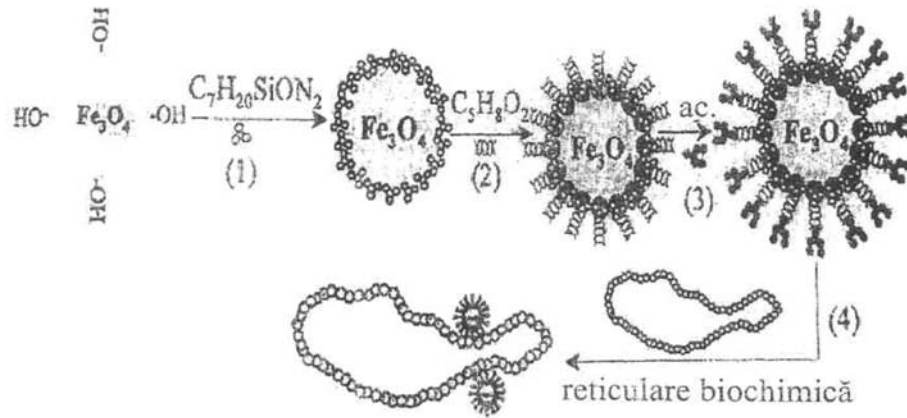


Fig. 1

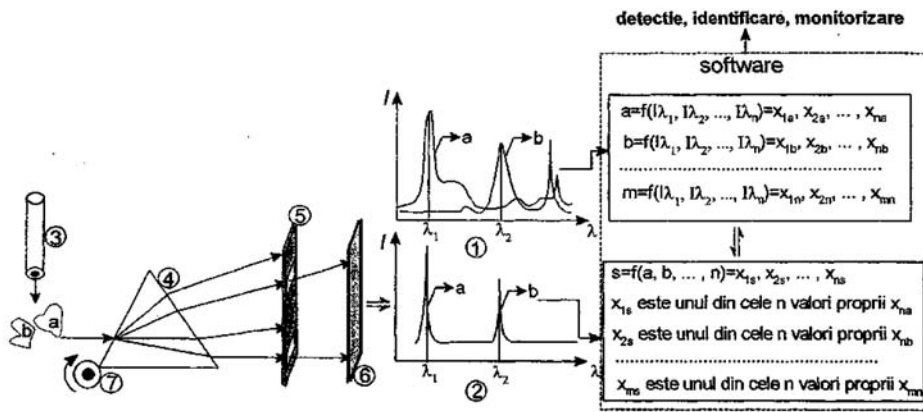


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01);

G01N 33/02 (2006.01)

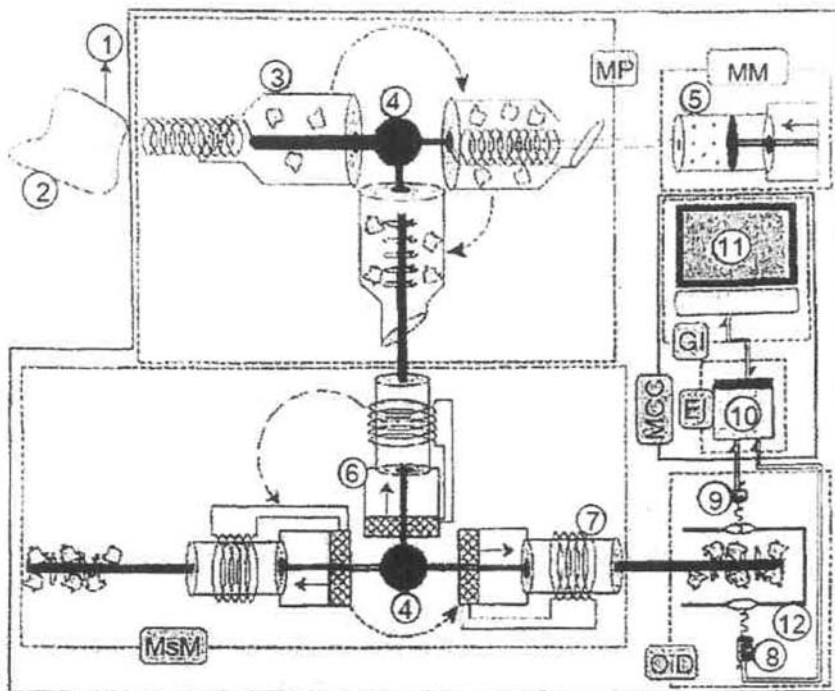


Fig. 3

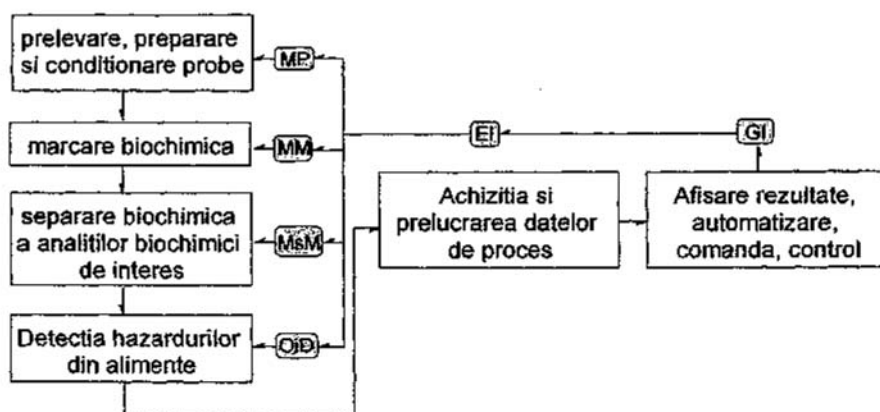


Fig. 4

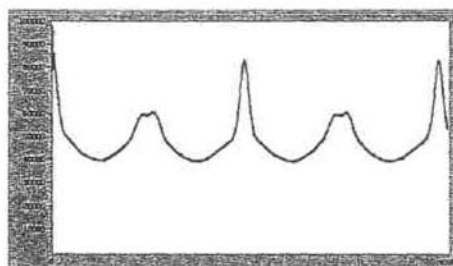


Fig. 5