

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00135**

(22) Data de depozit: **16.02.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**28.09.2012** BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:  
• **CENTRUL INTERNAȚIONAL DE  
BIODINAMICĂ,  
INTRAREA PORTOCALELOR NR. 1B,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **GHEORGHIU EUGEN, BD. UNIRII NR. 12,  
BL. 7 C, AP. 18, SECTOR 4, BUCUREȘTI,  
B, RO;**

• **DAVID SORIN, STR. S. CIHOSCHI NR. 7,  
AP. 4, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POLONSCHII CRISTINA,  
STR. STÂNJENEILOR NR. 5, BL. 3, SC. A,  
ET. 2, AP. 10, SINAIA, PH, RO;**  
• **BRATU DUMITRU, STR. VLAICU VODĂ  
NR. 4, BL. C14, AP. 13, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **DISPOZITIV DE DETERMINARE A CONCENTRAȚIEI UNOR  
MICROORGANISME PRIN APLICAREA CONTROLATĂ A  
UNUI STIMUL PERIODIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv de determinare a concentrației unor microorganisme într-un fluid, pe baza monitorizării variațiilor proprietăților optice, de exemplu, corespunzătoare rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR), și/sau electrice, de exemplu impedanța la o frecvență specifică, datorate modificărilor determinate de aplicarea unui stimul periodic prin intermediul unor câmpuri magnetice. Dispozitivul conform invenției este alcătuit dintr-un compartiment (1) de analiză legat, printr-un tub (4) de intrare, la un recipient (5) conținând o probă de analizat, și, printr-un tub (2) de ieșire, la o pompă (3) care, la rândul ei, este conectată, printr-un alt tub (6), la un rezervor (7) de evacuare, în interiorul compartimentului (1) de analiză fiind montat un senzor (8) conectat la un modul (9) de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață, și la un modul (10) de măsurare a impedanței electrice, în condițiile în care un modul (11) de acționare magnetică induce un câmp magnetic variabil în compartimentul (1) de analiză, determinând oscilația particulelor (19) din proba de analizat, particule (19) ce au fost transferate din recipient (5) în compartimentul (1) de analiză.

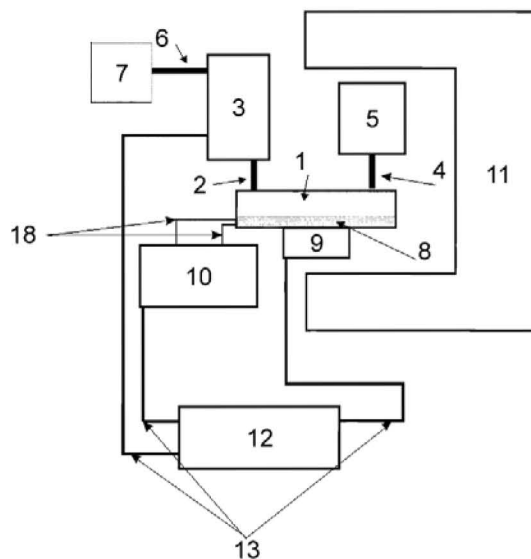


Fig. 1

Revendicări: 7  
Figuri: 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## Dispozitiv de determinare a concentrației unor micro-organisme prin aplicarea controlată a unui stimul periodic

### DESCRIERE

Invenția se referă la un dispozitiv de determinare a concentrației unor micro-organisme, ex patogene de interes, într-un fluid (ex lichid), având la bază monitorizarea variațiilor proprietăților optice (ex.: corespunzătoare Rezonanței Plasmonilor de Suprafață – SPR), sau/și electrice (ex.: impedanța la o frecvență specifică), datorate modificărilor (ex: deplasare, deformare) determinate de aplicarea unui stimul periodic prin intermediul unor câmpuri magnetice. Dispozitivul are aplicații în controlul calității apei și a alimentelor, precum și în biotehnologii și medicina, în domenii în care este importantă determinarea concentrației de microorganisme, inclusiv a celor patogene.

Dispozitive actuale de detectare a prezenței unor compuși într-o soluție de interes bazate pe principiile de recunoaștere specifică de tipul ligand - receptor se bucură de un interes deosebit, dat fiind faptul că răspund cerințelor de sensibilitate și specificitate impuse de aplicații în industria alimentară, farmaceutică și medicină. În categoria analiților țintă, se înscriu celule patogene, fiecare tip de dispozitiv impunând abordări diferite, Astfel:

- Un dispozitiv de detecție a micro-organismelor patogene folosind determinări de impedanță, prin utilizarea de anticorpi este prezentat în US Patent (Application) 20020076690. Este descris un dispozitivul de detecție a prezenței patogenilor atașați de particule acoperite cu anticorpi, prin măsurători de impedanță. Dispozitivul este alcătuit dintr-un canal de fluidică ce prezintă o pereche de electrozi interdigitați pe care sunt localizați anticorpii, un generator de câmp electric și un senzor de impedanță care măsoară impedanța între electrozi.
- US Patent 6764583 prezintă un dispozitiv care detectează prezența celulelor patogene capturate în câmp electric și constă dintr-un canal fluidic prin care sunt transportați patogenii, canal ce prezintă pe suprafață o pereche de electrozi interdigitați, o sursă de semnal alternativ și un sistem de măsură a impedanței.

Unul din dezavantajele dispozitivelor de mai sus constă în utilizarea unor suprafețe funcționalizate specific pentru un singur tip de analit. Aceasta înseamnă că în dispozitivele respective trebuie să se înlocuiască senzorul pentru a analiza un alt tip de analit. În plus, acest lucru implică un număr limitat de analize pentru că materialul bioactiv de la suprafață este perisabil, senzorii pierzându-și activitatea după un număr limitat de analize. Un alt dezavantaj constă din sensibilitatea limitată a acestor abordări, care se bazează exclusiv pe diferența semnalelor SPR, sau de impedanță dintre starea corespunzătoare analitului legat de senzor și cea premergătoare injectiei probei.

Un alt dezavantaj este reprezentat de necesitatea utilizării de electrozi interdigitați de dimensiuni mici a căror fabricare este dificilă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este amplificarea răspunsului corespunzător prezenței micro-organismelor țintă, prin aplicarea unei actuări periodice și posibilitatea reutilizării aceleiași suprafețe de detecție pentru mai multe analize și mai multe tipuri de micro-organisme, fără a fi nevoie de modificări asupra suprafeței senzorului.

Dispozitivul de determinare a concentrației unor micro-organisme prin aplicarea controlată a unui stimul periodic este constituit dintr-un compartiment de analiză în interiorul căruia se afla

un senzor analizat cu ajutorul unui modul de măsurare a impedanței electrice și un modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață în sine cunoscut, dintr-un modul de actoare magnetică cu rolul de a induce un câmp magnetic variabil în compartimentul de analiză determinând oscilații ale pozițiilor unor particule de analizat, dintr-un recipient cu proba de analizat și o pompă care asigură circulația lichidului în compartimentul de analiză prin intermediul unor tuburi.

Dispozitivul conform invenției are avantajul că utilizează suprafețe nemodificate cu elemente de biorecunoaștere, inerte (pasivate pentru a împiedica orice adsorbție). Specificitatea este dată de preincubarea probei de analizat cu particule super-paramagnetice bioafine, adică cu specificitate față de un anumit tip de microorganism și determinarea concentrației de microorganisme din analiza dimensiunii și numărului de conglomerate formate din interacția bioafină a acestor particule și microorganismele din probă.

Un alt avantaj este monitorizarea continuă a calității suprafeței de detecție, a probei și a parametrilor de funcționare ai sistemului de fluidică prin măsurători SPR concomitente cu analiza de impedanță. Nu în ultimul rând, un avantaj major al dispozitivului descris în aceasta invenție constă în sensibilitatea crescută care se obține prin amplificarea selectivă a semnalului în raport cu zgomotul. Aceasta amplificare se bazează în principal pe actuale periodică la o frecvență cunoscută.

Invenția descrie un dispozitiv de determinare cantitativă a concentrației unor micro-organisme patogene într-un fluid (ex. mediu lichid) pentru care există parteneri afini (anticorpi, aptameri etc).

În cele ce urmează este descris un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-7 care reprezintă

Fig. 1 Schema bloc a dispozitivului

Fig. 2 Detaliu - senzor

Fig. 3 Schema bloc a modulului de măsură a impedanței electrice

Fig. 4 Detaliu - compartimentul de analiză

Fig. 5. Amplitudinea semnalului corespunzător frecvenței de oscilație pentru particule indicatoare de 1 μm și particule indicatoare de 0.5 μm

Fig. 6 Diagrama deplasării magnetului permanent superior

Fig. 7 Curba de calibrare pentru determinarea concentrației de *E. coli*

Dispozitivul conform invenției se compune, în conformitate cu figura 1, dintr-un compartiment de analiză (1) legat de o pompă (3) printr-un tub de ieșire (2), și de un recipient cu proba de analizat (5) prin-un tub de intrare (4). Pompa (3) este conectată printr-un tub (6) la un rezervor de evacuare (7).

În interiorul compartimentului de analiză (1) se afla un senzor (8), conectat la un modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) și la un modul de măsurare a impedanței electrice (10).

Un modul de actoare magnetică (11) determină generarea de câmpuri magnetice variabile a căror parametri de ex. frecvență sau intensitate sunt variați după un profil ales de utilizator.

Pompa (3), modulul de măsurare a impedanței electrice (10), modulul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9), și modulul de actuare magnetică (11) sunt conectate la calculatorul personal PC (12) prin intermediul magistralelor de comunicație (13).

Senzorul (8) este format dintr-un substrat de sticlă pe care este depus un film metalic în care sunt realizați, conform cu figura 2, electrozii de măsură, respectiv electrodul superior (14) și electrodul inferior (15), zona activă de măsură SPR (16) și zona de măsură în lichid (17). Electrozii de măsură (14, 15) sunt conectați la modulul de măsurare a impedanței electrice (10) prin cablurile de legătură (18). Senzorul (8) este pasivat prin depunerea, deasupra filmului metalic, a unui strat subțire dintr-un material inert. Rolul senzorului este acela de a permite măsurarea modificărilor de impedanță și indice de refracție apărute în compartimentul de analiză ca urmare a prezenței unor analiți.

Combinarea electrozilor (14, 15) cu zona activă de măsură SPR (16) în zona de măsură în lichid (17) reprezintă unul din avantajele dispozitivului întrucât permite monitorizarea continuă a calității suprafeței de detecție, și a parametrilor de funcționare ai dispozitivului prin măsurători SPR ce se pot derula concomitent cu analiza de impedanță electrică.

Compartimentul de analiză (1) este o cavitate etanșă paralelipipedică cu baza reprezentată de suprafața senzorului (8) și prezintă două orificii corespunzătoare capetelor cavității, în care sunt introduse tuburile de intrare (4) și ieșire (2).

Modulul de măsurare a impedanței electrice (10), conform schemei bloc din figura 3, se compune dintr-un generator digital (20), un modulul de achiziție, control și transmisie a datelor (21) și bloc de filtrare și amplificare (22).

Modulul de măsură a rezonanței plasmonilor de suprafață (9), în sine cunoscut și nefigurat, este alcătuit dintr-un led, o prisma din material optic transparent și o matrice de fotodetectori și permite măsurarea indicelui de refracție a fluidului de deasupra senzorului (8).

Modul de funcționare al dispozitivului conform invenției.

Particulele de analizat (19) rezultate din preincubarea unei suspensii de microorganisme cu o suspensie de particule super-paramagnetice funcționalizate, respectiv modificate la suprafața lor cu elemente de biorecunoaștere (ex. anticorpi, aptameri) specifice microorganismelor din suspensie, sunt transferate în recipientul de probă (5) de unde suspensia este introdusă cu ajutorul pompei (3) printr-un tub (4) în compartimentul de analiză (1) reprezentat în figura 4.

Prin intermediul modulului de actuare magnetică (11) se induce un câmp magnetic ce determină controlat, un gradient de câmp magnetic orientat, de regulă perpendicular pe senzor (8) și colectarea particulelor de analizat (19) în compartimentul de analiză (1), pe senzor (8).

După colectarea particulelor de analizat (19) în compartimentul de analiză (1), pe senzor (8), în interiorul compartimentului de analiză (1), se induce prin intermediul modulului de actuare magnetică (11), un câmp magnetic de intensitate variabilă cu o frecvență și un profil al evoluției intensității ales de utilizator în funcție de proprietățile particulelor de analizat (19).

Combinarea dintre câmpul magnetic constant și câmpul magnetic de intensitate variabilă generate de modulul de actuare magnetică (11) determină oscilații ale pozițiilor particulelor de analizat (19). Amplitudinea acestor oscilații este proporțională cu proprietățile magnetice, și dimensiunea particulelor de analizat (19).

Oscilațiile particulelor de analizat (19) determină o creștere a amplitudinii semnalului AC măsurat de modulul de măsurare a impedanței electrice (10) corespunzătoare frecvenței de oscilație. Amplitudinea semnalului AC este proporțională cu mărimea particulelor de analizat (19) care oscilează, conform cu figura 5. Mărimea particulelor de analizat (19) este dependentă

de concentrația de microorganisme din suspensia preincubată cu particule super-paramagnetice. Particulele de analizat (19) constau, după caz, fie din particule super-paramagnetice, fie sunt aglomerări (clustere) formate din particule super-paramagnetice și microorganisme. Particulele super-paramagnetice specifice microorganismelor din suspensie formează cu microorganismele din suspensie clustere a căror dimensiune este proporțională cu concentrația de microorganisme din suspensie. Particulele super-paramagnetice specifice se vor lega numai de un anumit tip de microorganism și anume cel pentru care au elemente de biorecunoaștere specifice. Acest lucru combinat cu senzorul (8) pasivat reprezintă avantajul dispozitivului față de alte dispozitive similare de determinare a concentrației de microorganisme întrucât pentru determinarea unui alt tip de microorganism este nevoie doar de schimbarea tipului de particule superparamagnetice pentru a fi specifice pentru noul tip de microorganism.

Generatorul digital (20) din modulului de măsurare a impedanței electrice (10) generează o tensiune sinusoidală cu amplitudinea în domeniul  $20\mu\text{V} - 2\text{mV}$  și frecvența de 50 kHz, sau 500 kHz care este aplicată între electrozi (14, 15). Modificările de impedanță electrică a electrozilor (14, 15) datorate actuării magnetice cu ajutorul modulului de actuare magnetică (11) a particulelor de analizat (19) conduc la un semnal, măsurat continuu între electrozii superior (15) și inferior (14) care este amplificat de către blocul de filtrare și amplificare (22) și convertit digital și transmis la calculatorul PC (12) de către modulul de achiziție, control și transmisie a datelor (21). La calculatorul PC (12) se calculează, succesiv, spectrele de putere ale semnalelor corespunzătoare unor intervale cu durată controlată, se determină și se înregistrează amplitudinea semnalului pentru fiecare frecvență. Amplitudinea semnalului cu frecvența egală cu cea de actuare, reprezintă semnalul util utilizat în trasarea unei curbe de calibrare a răspunsului dispozitivului în funcție de concentrația de microorganisme din suspensia preincubată cu particulele super paramagnetice. În baza aceste curbe de calibrare se determină concentrația de microorganisme dintr-o suspensie necunoscută.

Modulul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) este bazat pe configurația prismatică, Kretschmann. Suprafața senzorului (8) este iluminată de led-ul modulului de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) sub un număr de unghiuri de incidență cunoscute și se măsoară intensitatea luminii reflectate pentru toate unghiurile de incidență, utilizând matricea de fotodetectori. Unghiului de incidență (unghi SPR) pentru care se realizează cuplajul rezonant cu plasmonii din stratul metalic de pe zona activă de măsură SPR (16), îi corespunde un minimum al intensității luminii reflectate. Unghiul SPR depinde de proprietățile mediului de deasupra suprafeței (proprietăți optice reprezentate de indicele de refracție). Valoarea unghiului SPR este proporțională cu poziția minimumului intensității luminii reflectate în matricea de fotodetectori. convertită digital și transmisă la calculatorul PC (12). Valoarea unghiului SPR este dependentă de indicele de refracție al mediului de deasupra zonei active de măsură SPR (16).

După determinarea amplitudinii de oscilare a particulelor de analizat (19) acțiunea câmpurilor magnetice generate de modulul de actuare magnetică (11) este oprită.

Compartimentul de analiză (1) este golit de suspensia de particule de analizat (19) cu ajutorul pompei (3) și transferată în rezervorul de evacuare (7). Recipientul cu probă (5) este înlocuit cu un alt recipient cu soluție salină care este trasă în compartimentul de analiză cu ajutorul pompei (3) operațiune numită spălare.

Se monitorizează zona activă de măsură SPR (16) și se verifică revenirea nivelului semnalului SPR de după spălare la nivelul semnalului SPR de dinaintea injectării suspensiei de particule de

analizat (19) în compartimentul de analiză. Diferența dintre cele două semnale arată gradul de curățare a senzorului (8) în vederea realizării unei noi analize.

Un exemplu de realizare a dispozitivului este prezentat mai jos:

Senzorul (8) este realizat dintr-un suport de sticlă de 0,3 mm grosime, acoperită cu un strat de aur (ex. cu grosimea de cca 50 nm), având proprietăți electrice (conductiv) și plasmonice (SPR). Suprafața senzorului cuprinde un set de doi electrozi pentru măsurătorile electrice (14, 15) prin tehnici de paternare. Electrocul superior (15) este comun cu zona activă de măsură SPR (16). Senzorul (8) este pasivat prin tiolizare, respectiv imersare într-o soluție de 11-mercapto-undecanol timp de 48 de ore. Senzorul (8) pasivat este plasat pe prisma unui modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9), cu configurație de tip Kretschmann, interfața optică fiind asigurată de un strat de ulei cu indice de refracție corespunzător unei deviații minime a fasciculului. Modulul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) este un dispozitiv tip TSPR1K23 (Texas Instruments SUA) care măsoară rezonanța plasmonilor de suprafață la nivelul senzorului (8).

Modulul de măsurare a impedanței electrice (10) este realizat conform schemei din figura 3.

Contactul dintre electrozi (14, 15) și cablurile de legătura (18) cu modulul de măsurare a impedanței electrice (10) se face utilizând pini metalici cu arc.

Prin generatorul digital (20) programat prin modulul de achiziție, control și transmisie a datelor (21) generează o tensiune sinusoidală cu amplitudinea în domeniul  $20\mu\text{V} - 2\text{mV}$  și frecvență de 50 kHz, sau 500 kHz. Tensiunea generată este aplicată la bornele electrozilor (14, 15). Semnalul AC măsurat la bornele electrozilor (14, 15) este aplicat la intrarea unui bloc de filtrare și amplificare (22). Semnalul de ieșire al blocului de filtrare și amplificare (22) este convertit digital și transmis de blocul (21) la calculatorul PC (12) prin comunicație serială tip RS-232.

Compartimentul de analiză (1) este realizat prin plasarea la suprafața senzorului (8) a unei garnituri din cauciuc siliconic cu grosimea de  $100\mu\text{m}$  care prezintă un orificiu de forma și dimensiunile zonei de măsură în lichid (17), respectiv 15mm lungime și 1mm lățime. Garnitura este presată superior de o placă de material plastic inert din punct de vedere biochimic (ex. poli-eter-eter-ketona) formându-se astfel pe senzor (8) o cavitate de 15mm lungime, 1mm lățime și  $100\mu\text{m}$  înălțime. Placa prezintă 2 orificii corespunzătoare capetelor cavității, în care sunt introduse tuburile de intrare (4) și ieșire (2). Toate tuburile componente (2, 4, 6) sunt din teflon și au diametrul interior de 0.5mm.

Pompa este o pompă de injecție cu o seringă de 2 ml care asigură un debit în domeniul 0.00625 – 50.0 ml/min.

Modulul de actuale magnetică (11) este alcătuit din două elemente componente, respectiv componenta de actuale inferioară și componenta de actuale superioară.

Componentele de actuale inferioară și superioară sunt alcătuite din două motoare pas cu pas, unul plasat inferior și unul plasat superior față de compartimentul de analiză (1), cu angrenaje de conversie a mișcării de rotație în deplasare liniară conectate la doi magneți permanenți, respectiv inferior și superior, prin intermediul unor tije. Magneții permanenți inferior și superior sunt reprezentați de cuburi din aliaj NdFeB, cu latura de 5 mm și cu o inducție magnetică remanentă de 1T.

Prin deplasarea magnetului permanent inferior sub senzor (8), se induce un câmp magnetic constant ce determină apariția unui gradient constant de câmp magnetic orientat perpendicular pe senzor (8), și colectarea particulelor de analizat (19) în compartimentul de analiza (1), pe senzor (8). Deplasarea magnetului permanent inferior se face cu ajutorul motorului pas cu pas inferior controlat de calculatorul PC (12).

Deplasarea periodică a magnetului superior pe o direcție, de regulă perpendiculară pe suprafața senzorului (8), în ambele sensuri, induce în interiorul compartimentului de analiză (1) un câmp magnetic cu gradient de intensitate variabilă, cu o frecvență și un profil al variației intensității în timp și spațiu, ales de utilizator în funcție de proprietățile particulelor de analizat (19).

În figura 6 se arată diagrama de deplasare a magnetului superior în funcție de distanța acestuia față de suprafața senzorului (8) și în timp. Magnetul superior este menținut la distanța  $Z_2$  față de suprafața senzorului (8). După un timp  $a$ , magnetul superior este apropiat la distanța  $Z_1$  față de suprafața senzorului (8) într-un interval de timp  $b$  și este menținut la distanța  $Z_1$  un interval de timp  $a$ . Apoi magnetul superior este deplasat la distanța  $Z_2$  în intervalul de timp  $b$  și ciclul se repetă. Pentru valorile particulare  $Z_2=34$  mm  $a=1200$   $Z_1=12$  mm  $b=877$ ms se obține o frecvență de oscilare de 0.24 Hz fiind aleasă astfel încât amplitudinea deplasării particulelor superparamagnetice de diametru 0,5 micrometri în interiorul compartimentului de analiză (1) să fie maximă.

Deplasarea magnetului permanent superior se face cu ajutorul motorului pas cu pas superior controlat de calculatorul PC (12).

Un exemplu de utilizare a dispozitivului de determinare a concentrației unor micro-organisme (*Escherichia coli*) prin aplicarea controlată a unui stimul periodic este prezentat mai jos.

Suspensia de particule super-paramagnetice se incubează cu suspensia care conține microorganismul țintă – *Escherichia coli*. Incubarea trebuie să conducă la legarea unui număr cât mai mare de celule, acest lucru depinzând de timpul de incubare și raportul dintre numărul de super-paramagnetice și numărul de microorganisme. Clusterelor de microorganisme și particulele super-paramagnetice formate, precum și o cantitate reziduală de particule nelegate de celule, se separă și se concentrează într-un volum redus ~ 100 μl constituind particulele de analizat (19) care sunt apoi injectate în compartimentul de analiză (1).

Particulele de analizat (19) sunt atrase de un magnet permanent inferior și reținute în compartimentul analitic (1) la suprafața senzorului (8). Se monitorizează semnalul SPR care crește pe durata acestei etape.

După stabilizarea semnalului se induc oscilații ale particulelor de analizat (19) prin deplasarea periodică pe direcție verticală a unui magnet permanent superior.

Frecvența de oscilare de 0.24 Hz fiind aleasă astfel încât amplitudinea deplasării particulelor de o anumită dimensiune în interiorul compartimentului de analiză (1) să fie maximă.

Etapa de actuație se realizează cu controlul frecvenței și al amplitudinii semnalului de oscilare.

Se înregistrează amplitudinea oscilațiilor măsurate cu dispozitivul care depinde de mărimea și numărul de clusteruri prezente în compartimentul de analiză (1). Datele sunt prelucrate prin normalizarea valorilor de amplitudine a oscilațiilor obținute pentru injecțiile de particule superparamagnetice incubate cu celule  $A_{cel}$ , la valoarea obținută pentru injecțiile de particule superparamagnetice simple  $A_{PM}$ , conform formulei:

$$A_{rel} = \frac{A_{cel}}{A_{PM}} - 1$$

Se opresc oscilațiile și se îndepărtează ambii magneți.

Sistemul se spală pentru îndepărtarea elementelor din compartimentul de analiză (1) prin trecerea prin compartimentul de analiză (1) a unei cantități de 2 ml de apă distilată cu un debit de 15 ml/min.

Prin reprezentarea amplitudinii relative a oscilațiilor la 0,24 Hz în funcție de concentrația inițială a microorganismelor din suspensia incubată cu PM, se poate trasa o curbă de calibrare (Tabelul 1 și Fig. 7 *E. coli*).

Concentrația de <i>E.coli</i> (cel/ml)	Amplitudinea relativa a oscilațiilor (V)	Deviația standard
0	0	±0.33
10 <sup>4</sup>	4.89	±0.75
10 <sup>5</sup>	13.00	±2.33
10 <sup>6</sup>	23.72	±1.50

Tabelul 1 Valori ale amplitudinii oscilațiilor pentru concentrații diferite de *E. coli* în probă

În baza curbei de calibrare se determină concentrația de microorganisme dintr-o suspensie necunoscută prin raportarea valorii amplitudinii oscilațiilor obținută la valoarea corespunzătoare din curba de calibrare.



**Revendicări**

1. Dispozitiv de determinare a concentrației unor micro-organisme prin aplicarea controlată a unui stimul periodic **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un compartiment de analiză (1) în interiorul căruia se afla un senzor (8) analizat cu ajutorul unui modul de măsurare a impedanței electrice (10) și un modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) în sine cunoscut, dintr-un modul de actuare magnetică (11) cu rolul de a induce un câmp magnetic variabil în compartimentul de analiză (1) determinând oscilații ale pozițiilor unor particule de analizat (19), dintr-un recipient (5) cu proba de analizat și o pompă (3) care asigură circulația lichidului în compartimentul de analiză (1) prin intermediul unor tuburi (2, 4, 6).
2. Dispozitiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** senzorul (8) este format dintr-un substrat de sticlă pe care este depus un film metalic pasivat prin depunerea strat subțire dintr-un material inert, în filmul metalic fiind realizați doi electrozi de măsură (14, 15) dintre care cel puțin unul conține o zonă activă de măsură SPR (16), iar electrozii (14, 15) sunt conectați la modulul de măsurare a impedanței electrice (10).
3. Dispozitiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** prin acțiunea câmpurilor magnetice generate de modulul de actuare magnetică (11), se produc oscilații ale pozițiilor particulelor de analizat (19) rezultate din preincubarea unei suspensii de microorganisme cu o suspensie de particule super-paramagnetice funcționalizate.
4. Dispozitiv conform revendicării 1, 3 **caracterizat prin aceea că** profilul evoluției intensității și frecvența câmpurilor magnetice generate de modulul de actuare magnetică (11) sunt un alese de utilizator.
5. Dispozitiv conform revendicării 1, 3, 4 **caracterizat prin aceea că** amplitudinea semnalului AC măsurat între electrozi (14, 15) de modulul de măsurare a impedanței electrice (10), corespunzătoare frecvenței de actuare, este dependentă de oscilațiile particulelor de analizat (19), fiind proporțională cu concentrația de microorganisme dintr-o suspensie preincubată cu particule super-paramagnetice.
6. Dispozitiv conform revendicării 1, 3, 4, 5 **caracterizat prin aceea că** amplitudinea oscilațiilor valorii unghiului SPR măsurat de modulul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9) la nivelul zonei active de măsură SPR (16) de pe suprafața senzorului (8), sau amplitudinea oscilațiilor intensității luminii pentru un unghi de incidență, fix ales corespunzător, este dependentă de oscilațiile particulelor de analizat (19), fiind proporțională cu concentrația de microorganisme dintr-o suspensie preincubată cu particule super-paramagnetice.
7. Dispozitiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** măsurarea semnalului AC între electrozi (14, 15) de către modulul de măsurare a impedanței electrice (10) și măsurarea valorii unghiului SPR de către modulul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9), sau a intensității luminii pentru un unghi de incidență, fix ales corespunzător, la nivelul zonei active de măsură SPR (16) se pot realiza simultan.

Desene

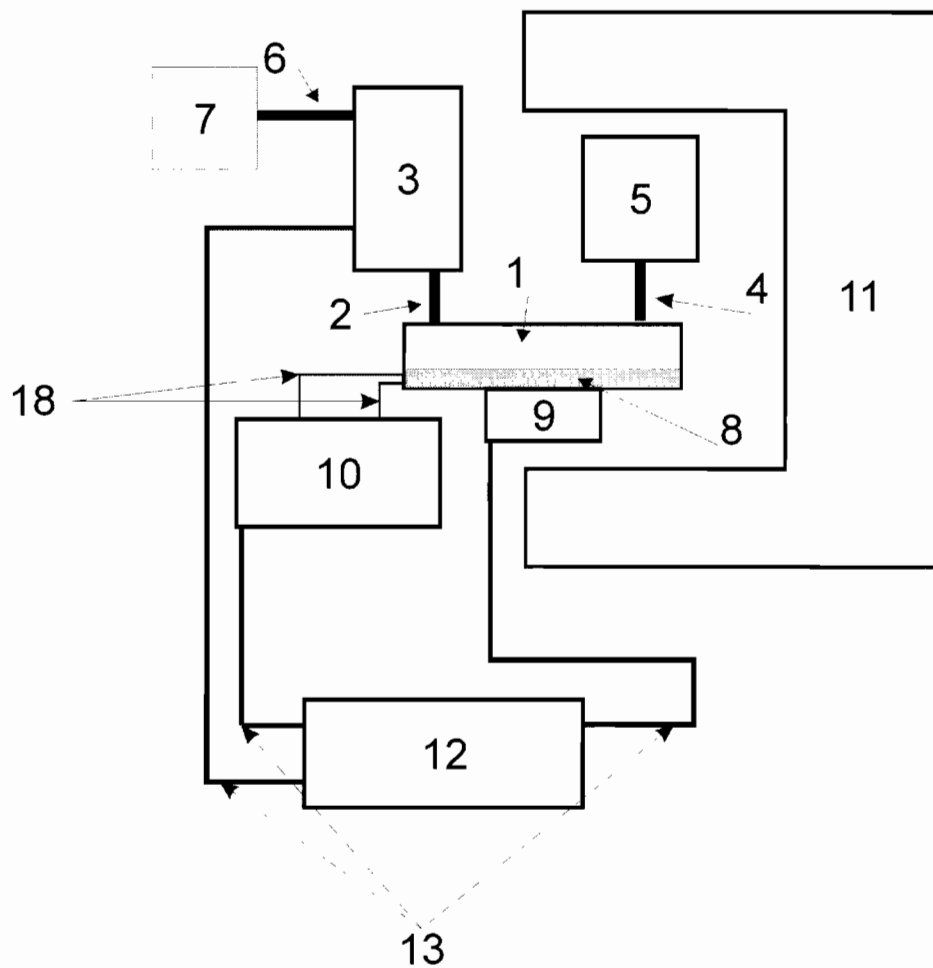


Fig. 1. Schema bloc a dispozitivului

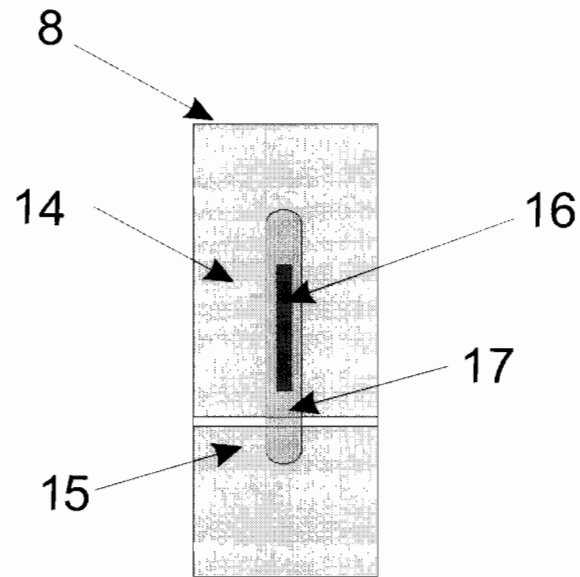


Fig. 2 Detaliu senzor

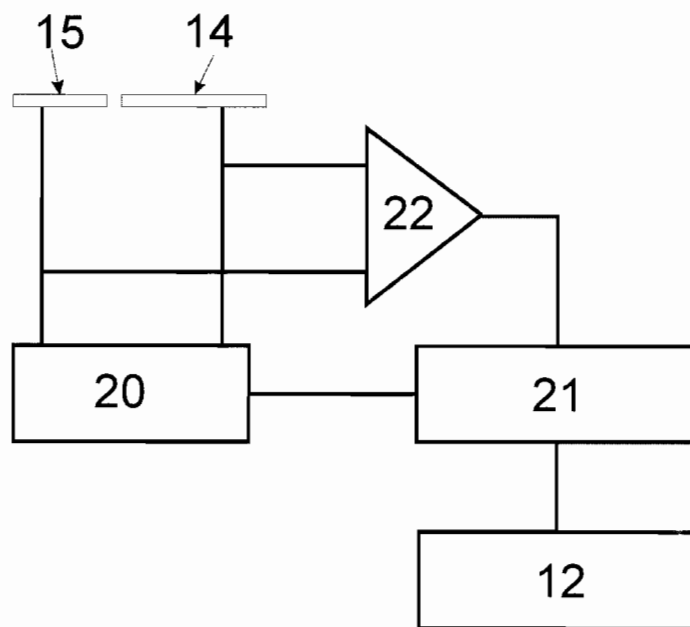


Fig. 3 Schema bloc a modului de măsură a impedanței electrice

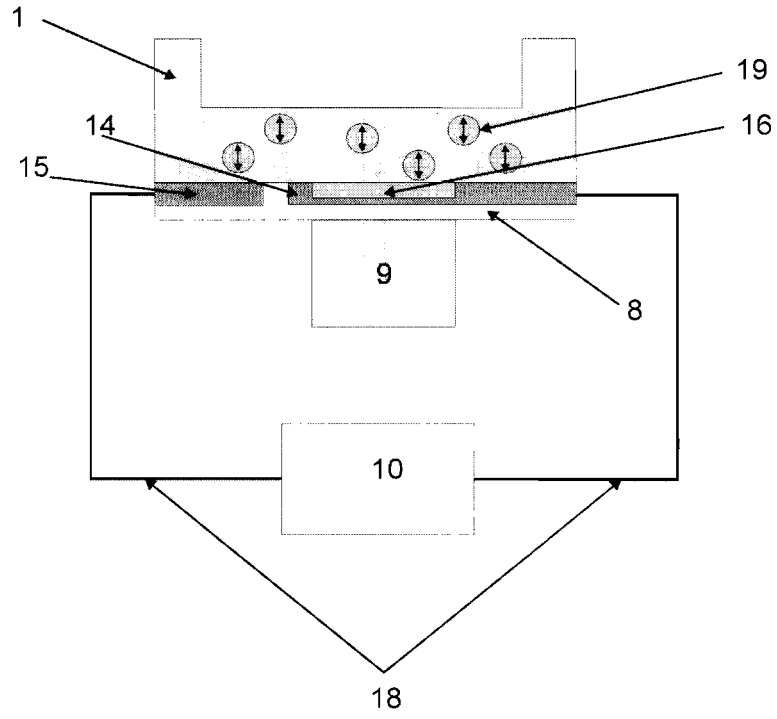


Fig. 4 Detaliu compartimentul de analiză

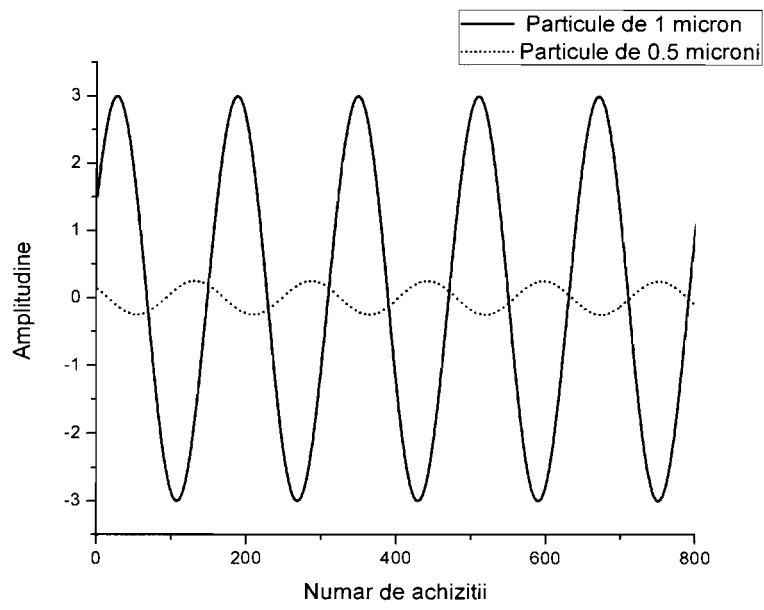


Fig. 5 Amplitudinea semnalului corespunzător frecvenței de oscilație pentru particule indicatoare de 1 $\mu$ m și particule indicatoare de 0.5 $\mu$ m.

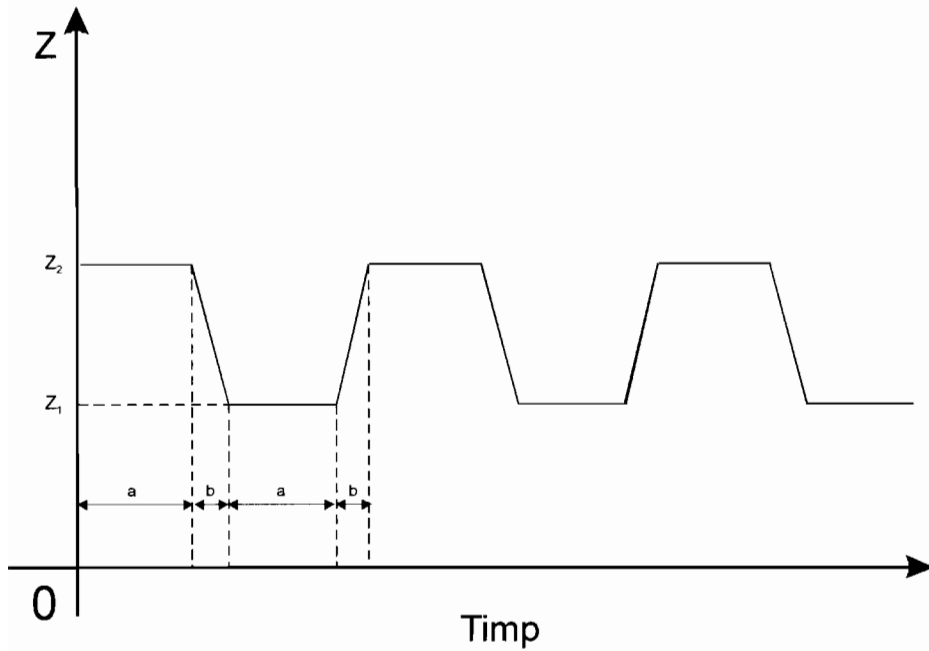


Fig. 6 Diagrama deplasării magnetului permanent superior.

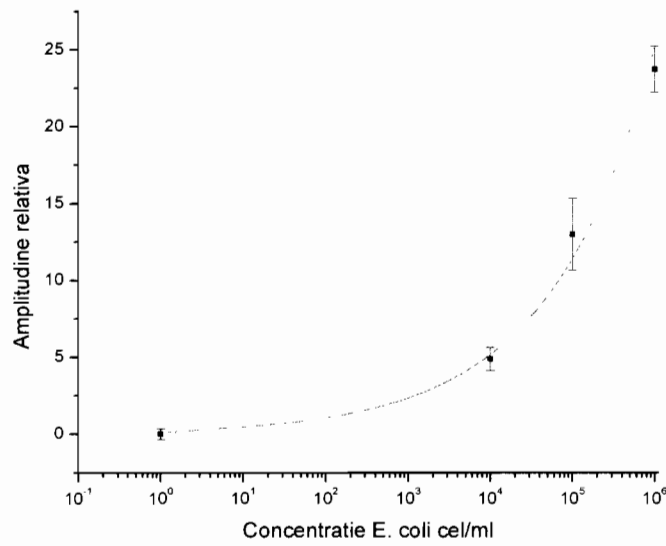


Fig. 7 Curba de calibrare pentru determinarea concentrației de *E. coli*