



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.07.2014** BOPI nr. 7/2014

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

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

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

• **DAVID SORIN,
STR.STANISLAV 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.C 14, AP.13, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2009/0045063 A1; EP 1729112 A1;
US 6764583 B2; US 2002/0076690 A1;
US 6437551 B1**

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



RO 127853 B1

1 Invenția se referă la un dispozitiv de determinare a concentrației unor microorganisme,
de exemplu, patogene, de interes, într-un fluid (de exemplu, lichid), având la bază monitorizarea
3 variațiilor proprietăților optice (de exemplu, corespunzătoare Rezonanței Plasmonilor de Supra-
față - SPR) sau/și electrice (de exemplu, impedanța la o frecvență specifică), datorate modifică-
5 rilor (de exemplu, deplasare, deformare) determinate de aplicarea unui stimul periodic prin inter-
mediul unor câmpuri magnetice. Dispozitivul are aplicații în controlul calității apei și al
7 alimentelor, precum și în biotehnologii și medicină, în domenii în care este importantă determi-
narea concentrației de microorganisme, inclusiv a celor patogene.

9 Dispozitivele 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
11 deosebit, dat fiind faptul că răspund cerințelor de sensibilitate și specificitate, impuse de
aplicațiile în industria alimentară, farmaceutică și medicină. În categoria analiților țintă, se
13 înscriu celulele patogene, fiecare tip de dispozitiv impunând abordări diferite, astfel:

- cererea de brevet de invenție **US 2009/0045063 A1** prezintă un dispozitiv și o metodă
15 de detecție a particulelor și microorganismelor, utilizând un câmp magnetic. Aparatul măsoară
câmpul magnetic indus de particulele și microorganismele încărcate electric, dintr-o probă
17 lichidă în mișcare, precum și proprietățile electrice ale acestora, extrăgând informații despre
tipul și concentrația acestora. Identificarea particulelor sau a microorganismelor se face prin
19 compararea mărimilor măsurate cu date de referință preexistente. Spre deosebire de acesta,
în dispozitivul descris de invenția noastră, este prevăzut cu un modul de acționare magnetică,
21 care generează câmpuri magnetice variabile asupra particulelor de analizat, rezultate din pre-
incubarea unei suspensii de microorganisme cu o suspensie de particule super-paramagnetice
23 funcționalizate, respectiv, modificate, la suprafața lor, cu elemente de biorecunoaștere (de
exemplu, anticorpi, aptameri), specifice microorganismelor din suspensie. Unul dintre dezavan-
25 tajele dispozitivului și metodei prezentate în **US 2009/0045063 A1** îl reprezintă necesitatea
creării unei baze de date, care să conțină proprietățile electrice și magnetice ale particulelor și
27 ale microorganismelor de analizat, pentru identificarea probei. Acest lucru implică studiarea
prealabilă a unui număr mare de probe cu caracteristici cunoscute;

29 - un dispozitiv de detecție a microorganismelor patogene, folosind determinări de
impedanță, prin utilizarea de anticorpi, este prezentat în cererea de brevet de invenție
31 **US 2002/0076690 A1**. Este descris un dispozitiv de detecție a prezenței patogenilor atașați de
particulele acoperite cu anticorpi, prin măsurători de impedanță. Dispozitivul este alcătuit
33 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
35 între electrozi;

- brevetul **US 6764583** prezintă un dispozitiv care detectează prezența celulelor pato-
37 gene capturate în câmp electric și constă dintr-un canal fluidic prin care sunt transportați pato-
genii, canal ce prezintă, pe suprafață, o pereche de electrozi interdigitați, o sursă de semnal
39 alternativ și un sistem de măsură a impedanței.

Unul dintre dezavantajele dispozitivelor de mai sus constă în utilizarea unor suprafețe
41 funcționalizate, specifice, 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
43 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
45 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
47 cea premergătoare injectiei probei.

RO 127853 B1

Un alt dezavantaj este reprezentat de necesitatea utilizării de electrozi interdigitați de dimensiuni mici, a căror fabricare este dificilă.	1
Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, este amplificarea răspunsului corespunzător prezenței microorganismelor țintă, prin aplicarea unei actualizări periodice, și posibilitatea reutilizării aceleiași suprafețe de detecție, pentru mai multe analize și mai multe tipuri de microorganisme, fără a fi nevoie de modificări asupra suprafeței sensorului.	3 5
Dispozitivul de determinare a concentrației unor microorganisme, prin aplicarea controlată a unui stimul periodic, este constituit dintr-un compartiment de analiză, în interiorul căruia se află un senzor, analizat cu ajutorul unui modul de măsurare a impedanței electrice, și un modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață, în sine cunoscute, dintr-un modul de acționare 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.	7 9 11 13
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 superparamagnetice 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.	15 17 19
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 această invenție constă în sensibilitatea crescută, care se obține prin amplificarea selectivă a semnalului, în raport cu zgomotul. Această amplificare se bazează, în principal, pe acționarea periodică, la o frecvență cunoscută.	21 23 25
Invenția descrie un dispozitiv de determinare cantitativă a concentrației unor microorganisme patogene într-un fluid (de exemplu, mediu lichid), pentru care există parteneri afini (anticorpi, aptameri etc.).	27 29
În cele ce urmează, este descris un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...7, care reprezintă:	31
- fig. 1, schema bloc a dispozitivului;	
- fig. 2, detaliu - senzor;	33
- fig. 3, schema bloc a modulului de măsură a impedanței electrice;	
- fig. 4, detaliu - compartimentul de analiză;	35
- fig. 5, amplitudinea semnalului corespunzător frecvenței de oscilație, pentru particule indicatoare de 1 μm și particule indicatoare de 0,5 μm;	37
- fig. 6, diagrama deplasării magnetului permanent superior;	
- fig. 7, curba de calibrare, pentru determinarea concentrației de <i>Escherichia coli</i> .	39
Dispozitivul conform invenției se compune, în conformitate cu fig. 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, printr-un tub de intrare 4. Pompa 3 este conectată, printr-un tub 6, la un rezervor de evacuare 7.	41 43
În interiorul compartimentului de analiză 1, se află 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.	45

RO 127853 B1

1 Un modul de acționare magnetică **11** generează câmpuri magnetice variabile, ai căror
parametri, de exemplu, frecvență sau intensitate, sunt variați după un profil ales de utilizator.

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

5 Senzorul **8** este format dintr-un substrat din sticlă, pe care este depus un film metalic,
7 în care sunt realizați, conform cu fig. 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**.

9 Electrozii de măsură **14** și **15** sunt conectați la modulul de măsurare a impedanței electrice **10**, prin cablurile de legătură **18**. Senzorul **8** este pasivat prin depunerea, deasupra filmului
11 metalic, a unui strat subțire dintr-un material inert. Rolul senzorului este acela de a permite
măsurarea modificărilor de impedanță și ai indicilor de refracție, apărute în compartimentul de
13 analiză, ca urmare a prezenței unor analiți.

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

19 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 de ieșire **2**.

21 Modulul de măsurare a impedanței electrice **10**, conform schemei bloc din fig. 3, se compune dintr-un generator
20, de curent, digital, un modul de achiziție, de control și de transmisie
23 a datelor **21**, și un bloc de filtrare și amplificare **22**.

25 Modulul de măsură a rezonanței plasmonilor de suprafață **9**, în sine cunoscut și nefigurat, este alcătuit dintr-o sursă de lumină,
o prismă din material optic transparent și o matrice de fotodetectori, și permite măsurarea indicelui de refracție a
fluidului de deasupra senzorului **8**.

Modul de funcționare a dispozitivului conform invenției

27 Particulele de analizat **19**, rezultate din preincubarea unei suspensii de microorganisme
29 cu o suspensie de particule superparamagnetice, funcționalizate, respectiv, modificate, la
suprafața lor, cu elemente de biorecunoaștere (de exemplu, anticorpi, aptameri), specifice
31 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
33 în fig. 4. Prin intermediul modulului de acționare magnetică **11**, se induce un câmp magnetic,
ce determină, controlat, un gradient de câmp magnetic, orientat, de regulă, perpendicular pe
35 senzorul **8**, și colectarea particulelor de analizat **19**, în compartimentul de analiză **1**, pe senzorul
8. După colectarea particulelor de analizat **19**, în compartimentul de analiză **1**, pe senzorul **8**,
37 în interiorul compartimentului de analiză **1**, se induce, prin intermediul modulului de acționare
magnetică **11**, un câmp magnetic de intensitate variabilă, cu o frecvență și un profil al evoluției
39 intensității ales de utilizator, în funcție de proprietățile particulelor de analizat **19**. Combinarea
câmpurilor magnetice, generate de modulul de acționare magnetică **11**, determină oscilații ale
41 pozițiilor particulelor de analizat **19**. Amplitudinea acestor oscilații este proporțională cu proprietățile
magnetice și dimensiunea particulelor de analizat **19**.

43 Oscilațiile particulelor de analizat **19** determină o creștere a amplitudinii semnalului AC,
măsurat de modulul de măsurare a impedanței electrice **10**, corespunzătoare frecvenței de
45 oscilație. Amplitudinea semnalului AC este proporțională cu mărimea particulelor de analizat
19, care oscilează, conform cu fig. 5. Mărimea particulelor de analizat **19** este dependentă de
47 concentrația de microorganisme din suspensia preincubată cu particule superparamagnetice.

RO 127853 B1

Particulele de analizat **19** constau, după caz, fie din particule superparamagnetice, fie sunt aglomerări (cluster) formate din particule superparamagnetice și microorganisme. Particulele superparamagnetice, specifice microorganismelor din suspensie, formează, cu microorganismele din suspensie, cluster, a căror dimensiune este proporțională cu concentrația de microorganisme din suspensie. Particulele superparamagnetice specifice se vor lega numai de un anumit tip de microorganism, și anume, de 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 **20** de curent, digital, din modulul de măsurare a impedanței electrice **10**, generează un curent sinusoidal, cu amplitudinea aleasă de utilizator în domeniul 10^{-7} A și 10^{-5} A, și frecvența de 50 sau 500 kHz, care este aplicată între electrozii **14** și **15**. Modificările de impedanță electrică, ale electrozilor **14** și **15**, datorate acidulării magnetice, cu ajutorul modulului de acționare 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, de control și de 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 acționare reprezintă semnalul util, utilizat în trasarea unei curbe de calibrare a răspunsului dispozitivului, în funcție de concentrația de microorganisme din suspensia preincubată cu particulele superparamagnetice. În baza acestei 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 sursa de lumină a 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 indicii de refracție). Valoarea unghiului SPR este proporțională cu poziția minimumului intensității luminii reflectată în matricea de fotodetectori, convertită digital și transmisă la calculatorul PC **12**. Valoarea unghiului SPR este dependentă de indicii de refracție al mediului de deasupra zonei active de măsură SPR **16**.

După determinarea semnalului util, corespunzător amplitudinii de oscilare a particulelor de analizat **19**, acțiunea câmpurilor magnetice, generate de modulul de acționare magnetică **11**, este oprită.

Compartimentul de analiză **1** este golit de suspensia de particule de analizat **19**, cu ajutorul pompei **3**, iar suspensia de particule de analizat **19** este transferată în rezervorul de evacuare **7**. Recipientul cu probă **5** este înlocuit cu un alt recipient cu soluție salină, care este introdusă 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.

RO 127853 B1

1 Un exemplu de realizare a dispozitivului este prezentat mai jos.

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

13 Modulul de măsurare a impedanței electrice **10** este realizat conform schemei din fig.
15 3. Contactul dintre electrozi **14** și **15**, și cablurile de legătură **18**, cu modulul de măsurare a
17 impedanței electrice **10**, se face utilizând pini metalici cu arc.

17 Prin generatorul **20** de curent, digital programat prin modulul de achiziție, de control și
19 de transmisie a datelor **21**, se generează un curent sinusoidal, cu amplitudinea aleasă de
21 utilizator în domeniul 10^{-7} și 10^{-5} A, și frecvența de 50 sau 500 kHz. Curentul generat, aplicat la
23 bornele electrozilor **14** și **15**, determină o tensiune AC, care este aplicată la intrarea unui bloc
25 de filtrare și amplificare **22**. Semnalul de ieșire al blocului de filtrare și amplificare **22** este con-
27 vertit digital și transmis, de blocul **21**, la calculatorul PC **12**, prin comunicație serială tip RS-232.
29 Compartimentul de analiză **1** este realizat prin plasarea, la suprafața senzorului **8**, a unei garni-
31 ture din cauciuc siliconic, cu grosimea de 100 μ m, care prezintă un orificiu de forma și dimen-
33 siunile zonei de măsură în lichid **17**, respectiv, 15 mm lungime și 1 mm lățime. Garnitura este
35 presată superior de o placă din material plastic, inert din punct de vedere biochimic (de
37 exemplu, poli-eter-eter-ketona), formându-se, astfel, pe senzorul **8**, o cavitate de 15 mm lungi-
39 me, 1 mm lățime și 100 μ m înălțime. Placa prezintă 2 orificii corespunzătoare capetelor cavității,
în care sunt introduse tuburile de intrare **4** și de ieșire **2**. Toate tuburile componente **2**, **4** și **6**
sunt din teflon, și au diametrul interior de 0,5 mm.

31 Pompa este o pompă de injecție cu o seringă de 2 ml, care asigură un debit în domeniul
33 0,00625...50,0 ml/min.

33 Modulul de acționare magnetică **11** este alcătuit din două elemente componente,
35 respectiv, componenta de acționare inferioară și componenta de acționare superioară.
37 Componentele de acționare inferioară și superioară sunt alcătuite din două motoare pas cu pas,
39 unul plasat inferior și celălalt 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 1 T.

41 Prin deplasarea magnetului permanent inferior, sub senzorul **8**, se induce un câmp
43 magnetic constant, ce determină apariția unui gradient constant de câmp magnetic, orientat
45 perpendicular pe senzorul **8**, și colectarea particulelor de analizat **19**, în compartimentul de
47 analiză **1**, pe senzorul **8**. Deplasarea magnetului permanent inferior se face cu ajutorul motorului
pas cu pas, inferior controlat de calculatorul PC **12**.

45 Deplasarea periodică a magnetului superior pe o direcție, de regulă, perpendiculară pe
47 suprafața senzorului **8**, în ambele sensuri, induce, în interiorul compartimentului de analiză **1**,
49 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**.

RO 127853 B1

În fig. 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, cu diametrul de 0,5 μ m, 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 microorganisme (*Escherichia coli*), prin aplicarea controlată a unui stimul periodic, este prezentat mai jos.

Suspensia de particule superparamagnetice 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 particule superparamagnetice și numărul de microorganisme. Clusterelor de microorganisme și particulele superparamagnetice formate, precum și o cantitate reziduală de particule nelegate de celule, se separă și se concentrează într-un volum redus ~ 100 μ l, 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, la frecvența de 0,24 Hz, frecvența de oscilare fiind aleasă, astfel încât amplitudinea deplasării particulelor cu o anumită dimensiune, în interiorul compartimentului de analiză 1, să fie maximă.

Etapă de acționare 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 clustere 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 magneti.

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 de mai jos și fig. 7A, *Escherichia coli*).

RO 127853 B1

Tabel

Valori ale amplitudinii oscilațiilor, pentru concentrații diferite de *Escherichia coli*, în probă

Concentrația de <i>Escherichia coli</i> (cel/ml)	Amplitudinea relativă a oscilațiilor (V)	Deviația standard
0	0	±0,33
10 ⁴	4,89	±0,75
10 ⁵	13,00	±2,33
10 ⁶	23,72	±1,50

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.

RO 127853 B1

Revendicări

1. Dispozitiv de determinare a concentrației unor microorganisme, prin aplicarea controlată a unui stimul periodic, constituit dintr-un compartiment de analiză (1), în interiorul căruia se află un senzor (8) conectat la un modul de măsurare a impedanței electrice (10) și un modul de măsurare a rezonanței plasmonilor de suprafață (9), în sine cunoscut, dintr-un recipient (5) cu proba de analizat, o pompă (3) care asigură circulația lichidului în compartimentul de analiză (1), prin intermediul unor tuburi (2, 4 și 6), **caracterizat prin aceea că** se mai compune dintr-un modul de acționare magnetică (11), care are rolul de a induce un câmp magnetic variabil în compartimentul de analiză (1), determinând oscilații ale pozițiilor unor particule de analizat (19), alcătuite din particule superparamagnetice, preincubate cu microorganismele de analizat, aduse în compartimentul de analiză (1), din recipientul (5), cu ajutorul pompei (3), prin intermediul unor tuburi (2, 4 și 6). 13
2. Dispozitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** senzorul (8) este format dintr-un substrat din sticlă, pe care este depus un film metalic, pasivat prin depunerea unui strat subțire dintr-un material inert, în filmul metalic fiind realizați doi electrozi de măsură (14 și 15), dintre care cel puțin unul conține o zonă activă de măsură SPR (16), iar electrozii (14 și 15) sunt conectați la modulul de măsurare a impedanței electrice (10). 15
3. Dispozitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, prin acțiunea câmpurilor magnetice, generate de modulul de acționare magnetică (11), se produc oscilații ale pozițiilor particulelor de analizat (19), rezultate din preincubarea unei suspensii de microorganisme cu o suspensie de particule superparamagnetice, funcționalizate. 19
4. Dispozitiv conform revendicărilor 1 și 3, **caracterizat prin aceea că** profilul evoluției intensității și frecvența câmpurilor magnetice generate de modulul de acționare magnetică (11) sunt alese de utilizator. 23
5. Dispozitiv conform revendicărilor 1, 3 și 4, **caracterizat prin aceea că** amplitudinea semnalului AC, măsurat între electrozi (14 și 15), de modulul de măsurare a impedanței electrice (10), corespunzătoare frecvenței de acționare, este dependentă de oscilațiile particulelor de analizat (19), fiind proporțională cu concentrația de microorganisme dintr-o suspensie preincubată cu particule superparamagnetice. 27
6. Dispozitiv conform revendicărilor 1, 3, 4 și 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 superparamagnetice. 33
7. Dispozitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** măsurarea semnalului AC, între electrozi (14 și 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 poate realiza simultan. 37

(51) Int.Cl.

G01N 27/06 (2006.01),

G01N 27/02 (2006.01),

G01N 21/55 (2006.01),

G01N 33/487 (2006.01)

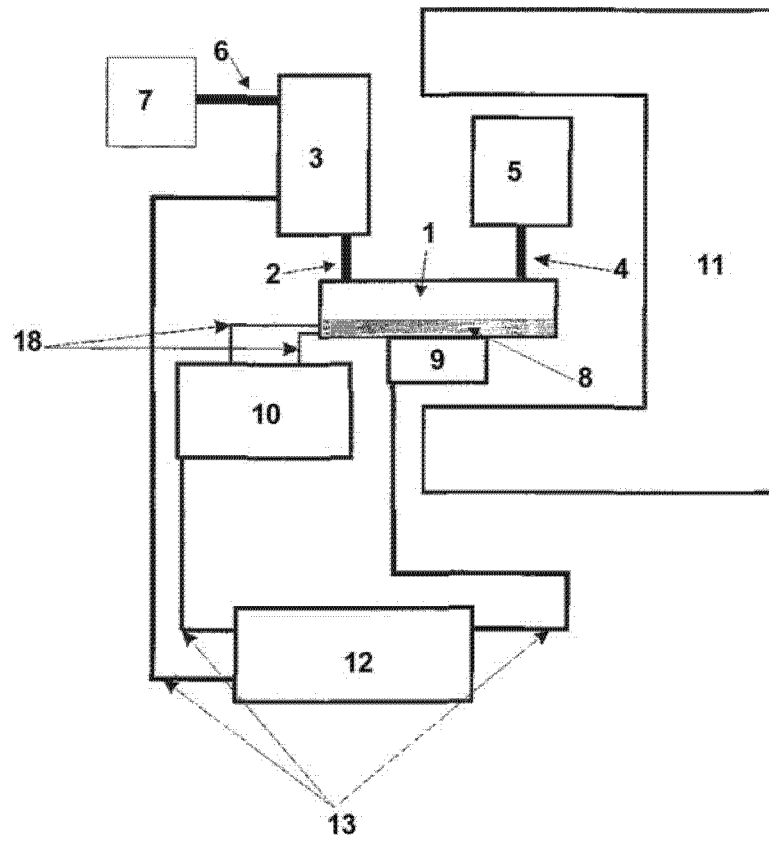


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 27/06 (2006.01),
G01N 27/02 (2006.01),
G01N 21/55 (2006.01),
G01N 33/487 (2006.01)

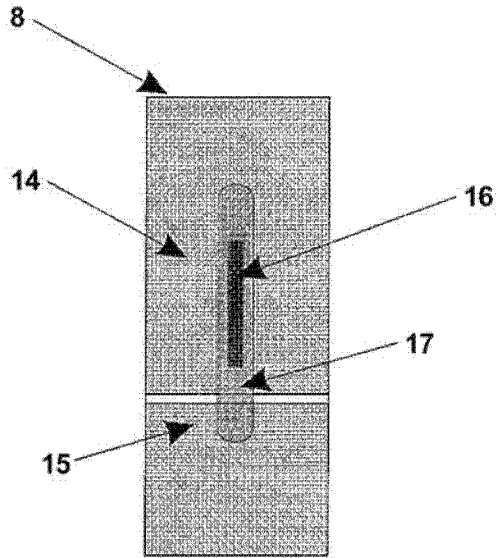


Fig. 2

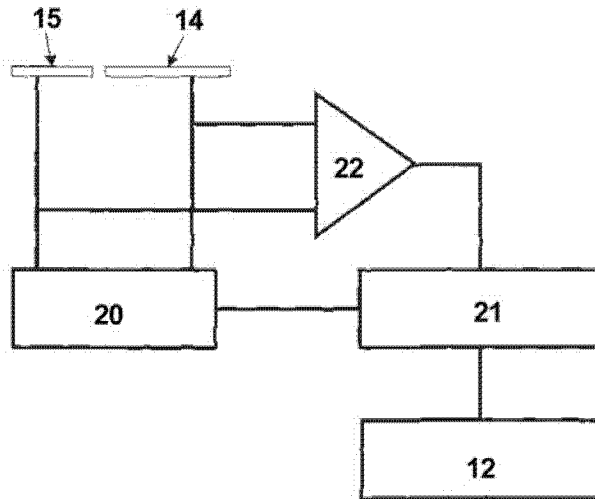


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 27/06 (2006.01),
G01N 27/02 (2006.01),
G01N 21/55 (2006.01),
G01N 33/487 (2006.01)

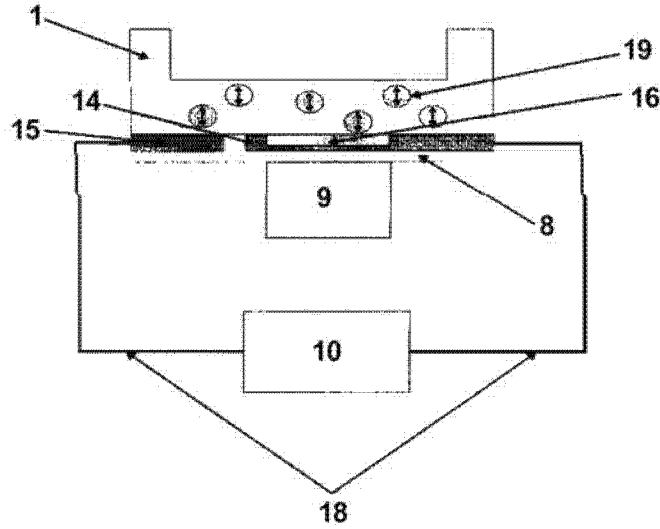


Fig. 4

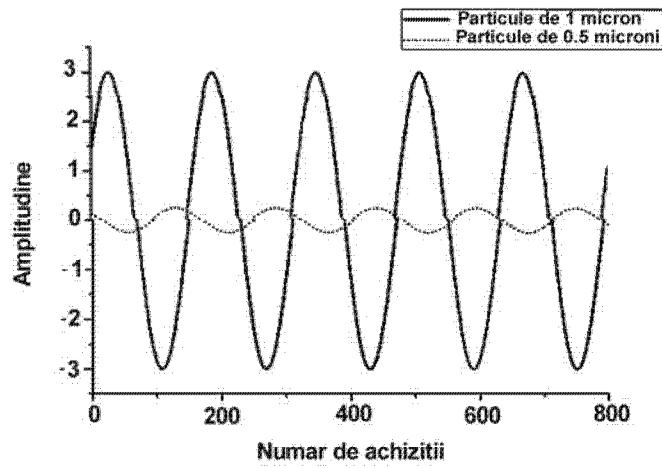


Fig. 5

(51) Int.Cl.

G01N 27/06 (2006.01),
 G01N 27/02 (2006.01),
 G01N 21/55 (2006.01),
 G01N 33/487 (2006.01)

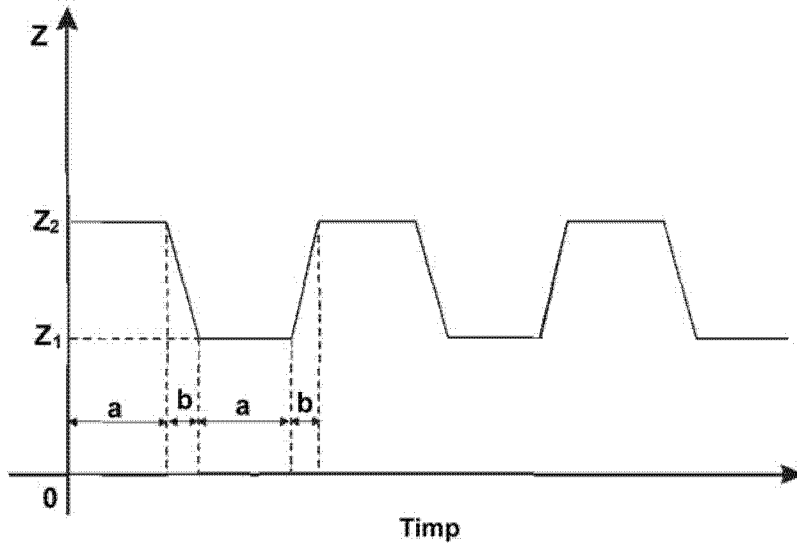


Fig. 6

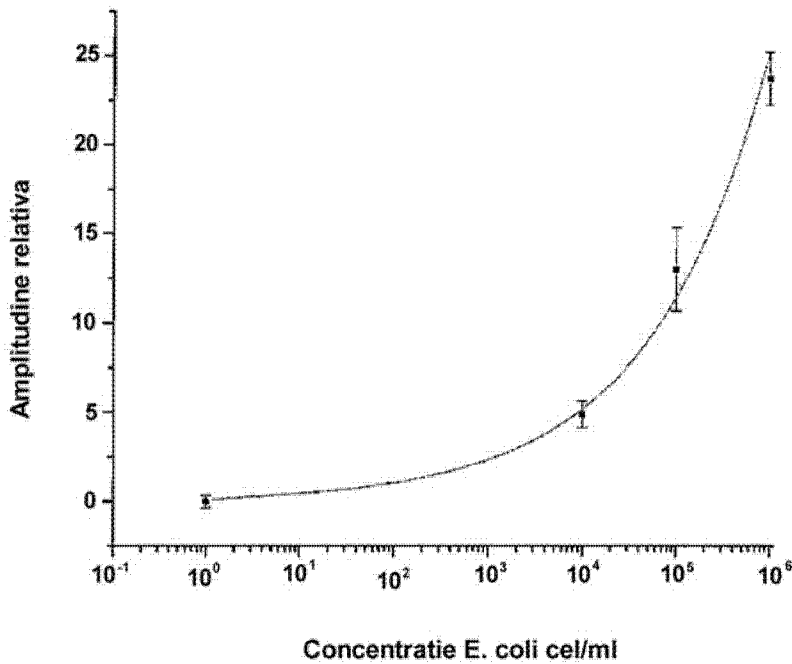


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 480/2014