

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00764**  
(22) Data de depozit: **26.10.2012**

(41) Data publicării cererii:  
**30.04.2014** BOPI nr. 4/2014

(71) Solicitant:

• **IVANA SIMONA**,  
STR. ȘERBAN GHEORGHE NR. 93,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **IORDACHE 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. ÔLTENIA 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;  
• **IORDACHE 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. ÔLTENIA 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

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

(57) Rezumat:

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*, *Campylobacter spp.* din alimente. Metoda conform invenției constă în cuantificarea fluorescenței, luând ca referință lungimile de undă din spectrul de fluorescență caracteristic al fiecărui microorganism urmărit, stabilirea unei relații univoce între fluorescența aminoacizilor naturali ai microorganismelor țintă și tipul microorganismelor ce au generat-o, fluorescența specifică fiind direct proporțională cu tipul și concentrația aminoacizilor excitați, spectrul de fluorescență caracteristic fiecărui microorganism identificat fiind obținut prin excitația, cu o sursă luminoasă, a unei probe de aliment condiționată cu nanoparticule paramagnetice de  $Fe_3O_4$ , funcționalizate specific, colectate direct prin imunosepararea magnetică, în care nanoparticulele paramagnetice de  $Fe_3O_4$  sunt acoperite cu un strat organosilanic cu funcționalitate aminată, pentru prevenirea proceselor de degradare chimică și de aglomerare micromagnetică, după care, ulterior, acestea sunt funcționalizate în mediu bazic cu glutaraldehidă, proteină A, sau anticorpi specifici *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter*. Dispozitivul conform invenției integrează cinci module, fiecare dintre acestea îndeplinind funcții diferite: un micromodul (MP) ce prelevează și condiționează direct probele de alimente în vederea marcării biochimice, un micromodul (MM) de marcarea biochimică, ce injectează controlat în primul micromodul (MP) nanoparticule funcționalizate cu anti-

corpi specifici, un micromodul (MsM) de separare magnetică, ce integrează o microsondă magnetică, destinată separării controlate a hazardurilor marcate cu anticorpi, un micromodul (Oid) de detecție ce integrează o interfață optică, concepută pentru a integra și scana microsonda magnetică, și un micromodul (MCC) de comandă și control.

Revendicări: 4  
Figuri: 5

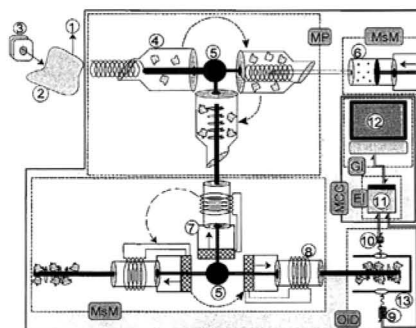
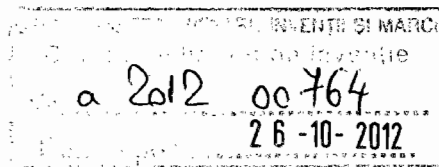


Fig. 3

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).





Metodă și dispozitiv pentru identificarea simultană a microorganismelor de tip *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* din alimente

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

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

Din brevetul RO 125797 se cunoaște o metodă și un dispozitiv sondă fluorometrică 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 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 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.

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

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii prezintă următoarele dezavantaje: limitarea tehnicii instrumentale în raport cu posibilitățile de scanare a structurii morfochimice și funcționalității genetice ale microorganismelor; uzarea morală continuă a tehnicilor de identificare actuale datorită modificărilor survenite la nivelul structurii genetice și morfochimice; numărului mare de interferenți chimici și

biochimici proveniți din mediul monitorizat care, pot apărea în situații reale de detecție biologică, datorită proprietăților chimice și funcționalității lor chimice și biologice asemănătoare cu cele ale microorganismelor țintă; limitării modalităților de prelevare ale analiților biologici datorate numărului mic de microorganisme prezente în mediul monitorizat: acest impediment are ca rezultat limitarea sensibilitatii, specificității și rapidității proceselor de detecție și de cuantificare; costuri operaționale ridicate versus timp mare de răspuns și numărul redus de microorganisme sensibilizate.

În pofida multor cercetări avansate în domeniul detecției biologice, problema discriminării tipului și clasei de microorganisme oscilează în jurul tehnicilor deja elaborate, fundamentate pe conceptele de recunoaștere imunologică, recunoaștere biochimică specifică, metode optice (fluorescență). Astfel, microscopia optică oferă un număr redus de informații, referitor la tipul de microorganisme prezent în mediul de analiză. Determinarea 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 inhibarea aglutinării este un test biochimic complex, caracteristic dar care prezintă dezavantajul că necesită un timp îndelungat și resurse financiare considerabile. Testele de 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 de confirmare limitată, care se desfășoară în timp îndelungat și costuri ridicate. Cromatografia în strat subțire, testele de imunofluorescență (directă, indirectă și complementară), testele de imuno-adsorbție enzimatică (directă, indirectă, competitive), IAHA, CF (complement fixation), neutralizare virală și Western Blot sunt teste antigen-anticorp cu înaltă specificitate, dar care necesită proceduri speciale de condiționare a probelor, timp mare de confirmare și costuri ridicate. Testele de tip RBIA (real time biospecific 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 cu înalt grad 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 care 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 marcare pentru recunoașterea microorganismelor țintă, putând induce evenimente false de sensibilizare ca urmare a dispersiei moleculelor de fluocrom în structuri moleculare diferite de analiții țintă.

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

Metoda, conform invenției, elimină dezavantajele soluțiilor cunoscute și constă în cuantificarea fluorescenței, luând 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 imunosepararea magnetică, fără a necesita procese intermediare de condiționare și prelucrare biochimică, în care nanoparticulele paramagnetice de  $Fe_3O_4$  sunt acoperite cu un strat organosilanic cu funcționalitate aminată, pentru prevenirea proceselor de degradare chimică și de aglomerare micromagnetică, după care ulterior, acestea sunt funcționalizate în mediu bazic cu glutaraldehidă, proteina A, sau anticorpilor specifici *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter*.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- pot fi detectate, identificate și monitorizate simultan mai multe tipuri microorganismele țintă, fără a compromite precizia și timpul de răspuns;
- detectia are loc fără a marca fluorocromic anticorpilor specifici sau nanoparticulele funcționalizate;
- sistemul de detecție este automatizat;
- elimină etapele intermediare de condiționare a probelor;
- este îmbunătățită precizia identificării microorganismelor prin limitarea apariției evenimentelor false de detecție, datorate difuziei fluorocromilor de marcare;
- dispozitivul permite monitorizarea continuă a probelor de analiți din fluxul de alimente monitorizat

-dispozitivul prezintă o structură unitară, multimodulară, este portabil, și poate fi integrat flexibil în aplicații de detecție ale hazardurilor, direct în fluxul de fabricare a alimentelor (preparare, ambalare, etc.).

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

-fig. 1 principiul și succesiunea proceselor de funcționalizare, marcare biochimică și prelevare a probelor de microorganisme țintă din alimente.

-fig. 2 principiul metodei de identificare biochimică vectorizată (orientată).

-fig. 3 diagrama structurală pentru realizarea metodei invenției.

-fig. 4 fluxul de materiale și informații;

-fig.5 spectrul de fluorescență specifică achiziționat pe nanoparticule de  $Fe_3O_4$  reticulate pe *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*., reticulate de nanoparticule funcționalizate de  $Fe_3O_4$ ;

Metoda, conform invenției implica următoarele echipamente de analiză:

-pentru excitare a fost folosită o sursă DT-MINI-2-GS-Ocean Optics, cuplată în configurație de fluorescență cu doi fotomultiplicatori PMC-100-3 pentru a obține spectrele de fluorescență specifică.

- datele de proces au fost colectate utilizând o placă de achiziție ultrarapidă P7888-FAST ComTec, cu patru canale de achiziție, în configurație 'time difference'.

spectrul de fluorescență a fost achiziționat pentru acele procese de fluorescență specifică cu timpul de viață de mai mic de 4095 ns.

-mediul software de detecție, identificare, monitorizare, automatizare, comandă și control a fost LabView.

Metoda pentru identificarea microorganismului, conform invenției cuprinde parcurgerea următoarelor etape ( algoritm)

spectrul de fluorescență achiziționat este prelucrat software, astfel încât, să poată fi diferențiate toate maximele de fluorescență;

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);

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  $\lambda_i$  (pentru a corecta și determina contribuția cu ponderile cele mai mari);

se aduc corecțiile de fluorescență datorate anticorpilor de marcarea biochimică utilizați (în vederea îndepărtării contribuției lor);

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;

se trasează matrici de referință de identificare pentru fiecare microorganism țintă din alimente (fig. 3), în funcție de spectrele de fluorescență specifică.

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.

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 separarea imunomagnetică.

Prelevarea hazardurilor din probele de alimente este realizată utilizând nanoparticule de  $Fe_3O_4$  funcționalizate cu anticorpi specifici microorganismelor țintă, conferă astfel o specificitate înaltă proceselor de identificare a microorganismelor vizate. Deasemenea, prin utilizarea nanoparticulelor de  $Fe_3O_4$ , 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 microorganisme, 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 un strat organosilanic cu funcționalitate aminată, astfel încât, să prevină procesele de degradare chimică și procesele de aglomerare micromagnetică induse de nanoparticulele 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 funcționalizarea ulterioară a  $Fe_3O_4$  cu glutaraldehidă sau proteina A. Funcționalizarea nanoparticulelor cu anticorpi este realizată direct în mediu bazic, la pH 11-12. Nanoparticulele funcționalizate cu anticorpi specifici, utilizate în procesul de marcarea biochimică, se prezintă sub formă de suspensie, având o concentrație de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Detecția simultană a mai multe microorganisme diferite din proba investigată, presupune cuantificarea spectrului de fluorescență achiziționat, în vederea determinării intensităților emisiilor de fluorescență (la  $\lambda_1 \dots \lambda_n$ ) și compararea lor ulterioară cu valorile înregistrate în bazele de date cu valori de referință ale intensităților de fluorescență emise 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 de microorganisme prezente în probă (fig. 3), depinzând de concentrație și de tipul acestora:

$$I_f = v_i \sum \lambda_i,$$

unde:

$I_f$  este semnalul de fluorescență total înregistrat;

$v_i$  este contribuția emisiei de fluorescență caracteristice microorganismului țintă  $i$ .

$\lambda_i$  este intensitatea maximă de emisie de fluorescență a microorganismului țintă  $i$ .

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

Matricile de identificare a hazardurilor din alimente fac parte integrantă din structura software-ului de detecție, identificare și monitorizare a sistemului propus.

Conform invenției, dispozitivul de detecție în timp real a microorganismelor din alimente integrează cinci module, fiecare din acestea îndeplinind funcții diferite

în 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 de marcarea biochimică (MM) care injectează controlat în MP nanoparticule funcționalizate cu anticorpi specifici, în vederea reticulării specifice a hazardurilor țintă; un micromodul de separare magnetică (MsM) care, integrează o microsondă magnetică, automatizabilă, destinată separării controlate a hazardurilor marcate cu anticorpi; un micromodul de detecție (OiD) care integrează o interfață optică, concepută pentru a integra și scana microsonda magnetică, încărcată cu microorganisme marcate biochimic; un micromodul de comandă și control (MCC) care, integrează două interfețe care: integrează electronica necesară pentru amplificarea semnalelor de detecție achiziționate, precum și pentru realizarea interfețelor electronice necesare automatizării și controlului (EI), precum și o interfață care, integrează echipamentele periferice necesare (GI: HMI, convertori) configurării parametrilor de detecție, automatizare și controlul dispozitivului.

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 microorganisme de interes, prezente în alimente. După finalizarea procesului de dezintegrare (~ 1-2 minute), microsistemul 5 (fig. 3) poziționează automat microinjectorul 6 de marcarea biochimică care, injectează suspensia de nanoparticule funcționalizate cu anticorpi specifici. Alimentele dezintegrate mecanic rămân în contact cu nanoparticulele funcționalizate timp de câteva minute (~ 1-2 minute), astfel încât, să se poată fi efectuată reticularea eficientă a microorganismelor prezente în proba investigat. După finalizarea procesului de marcarea biochimică, microcamera 4 de prelevare este poziționată automat, astfel încât, microsonda magnetică 7 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 un minut iar intensitatea câmpului magnetic este ajustată, astfel încât, procesele de separare să aibă loc rapid și eficient. Microsonda magnetică 7 încărcată cu microorganisme țintă este



poziționată automat în interiorul unei interfețe optice izolate 13 care asigură scanarea suprafeței sondei. Semnalele generate la nivelul interfeței optice sunt transferate ulterior către interfața electronică a micromodulului MCC (11), în vederea amplificării, prelucrării și transformării lor în informații utile de proces. Informațiile de proces vor fi afișate la nivelul interfeței grafice 12 sub formă de rapoarte de proces, astfel încât, factorii de decizie să poată reacționa în timp util. Tot la nivelul interfeței grafice 12 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 4 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 de dezintegrare a probelor. Procesul de dezintegrare a probelor are loc imediat după introducerea lor în camera de prelevare care, este prevăzută cu un microsistem 5 de poziționare a probelor prelevate, în pozițiile corespunzătoare diferitelor faze ale procesului de detecție. Micromodulul de marcare biochimică (MM) integrează un microinjector 6 de marcare 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 7 dotată cu un ac magnetizabil de prelevare. Microsonda 7 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 7 magnetică, bobina de magnetizare și actuatorul liniar sunt poziționate pe suportul unui microactuator rotativ, care 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 dipole magnetic.

La  $\lambda=290$  nm aminoacizii naturali absorb radiația cu randamente de excitare diferite, spectrul de fluorescență având randamente de emisie caracteristice fiecărui aminoacid. 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) a radiațiilor detectate de

ho

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 radiația de fond.

Dispozitivul, conform invenției are următoarele caracteristici de performanță:

- timp de prelevare: maxim 5 minute.
- timp de detecție: maxim 4 minute.
- timp de identificare: maxim 3 minute.
- greutate: maxim 25 Kg.
- automatizare, comandă, control.

## REVEDICĂRI

1. Metodă de identificare simultană a microorganismelor de tip *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* din alimente **caracterizată prin aceea că,**

constă în cuantificarea fluorescenței, luând 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.

2. Metodă, conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că,**

spectrul de fluorescență caracteristic fiecărui microorganism identificat este 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 imunosepararea magnetică, fără a necesita procese intermediare de condiționare și prelucrare biochimică.

3. Metodă, conform revendicării 2 **caracterizată prin aceea că,**

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

4. 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

(MsM) care injectează controlat în (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 microorganisme 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 și o interfață grafică (12; GI) destinată automatizării, controlului și configurării parametrilor de detecție ai echipamentelor periferice ale dispozitivului.

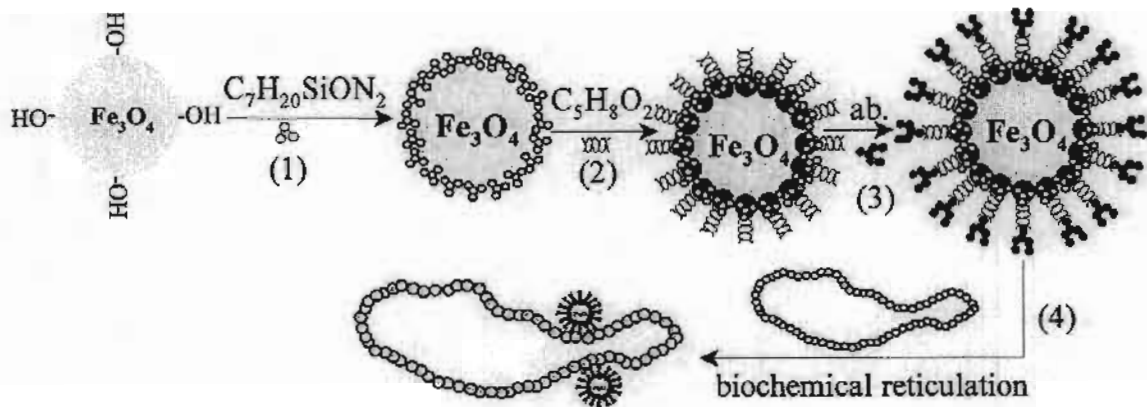


Fig. 1. Principiul și succesiunea proceselor de funcționalizare, marcarea biochimică și prelevare a probelor de analiți biochimici din alimente:

- 1 – acoperirea  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cu organosilan;
- 2 - funcționalizarea  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cu glutaraldehidă (GL) sau proteina A;
- 3 – funcționalizarea  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (GL) cu anticorpi specifici ( $\text{ab.}$ );
- 4 – marcarea biochimică.

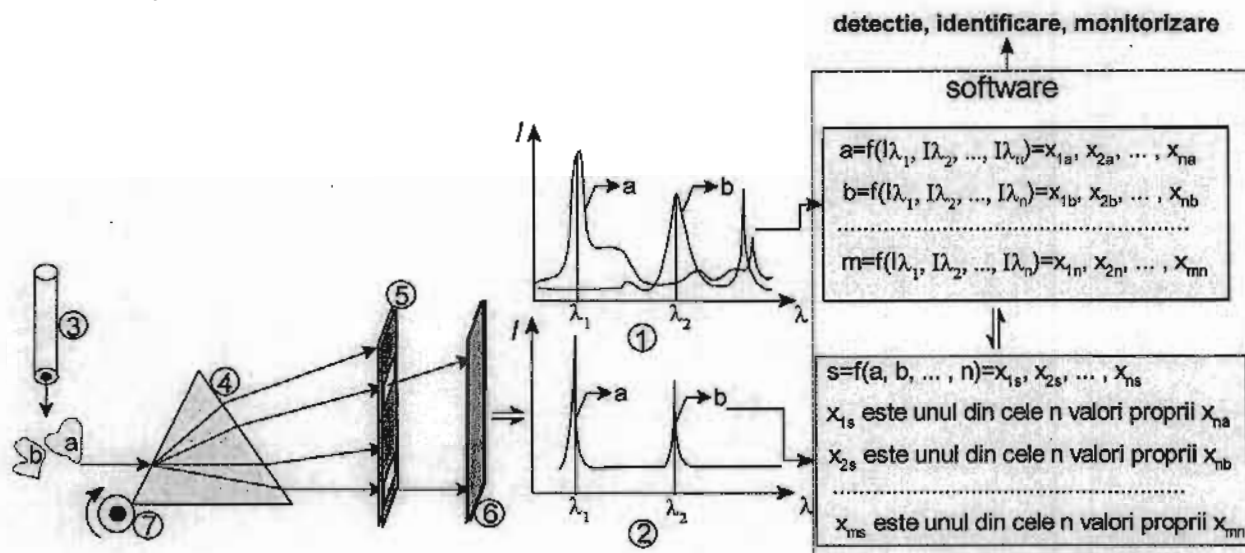


Fig. 2. Principiul metodei și structura software-ului de identificare biochimică vectorizată (orientată):

- 1 – spectrele de fluorescență specifică al microorganismelor țintă a și b (bază de date);
- 2 – spectrul real achiziționat prin filtrare;
- 3 – sursă de lumină;
- 4 – sistem de dispersie al radiației de scanare;
- 5 – sistem de filtrare;
- 6 – detector;
- 7 – microactuator de comandă și control a poziției sistemului de dispersie (selector automat al lungimii de undă)

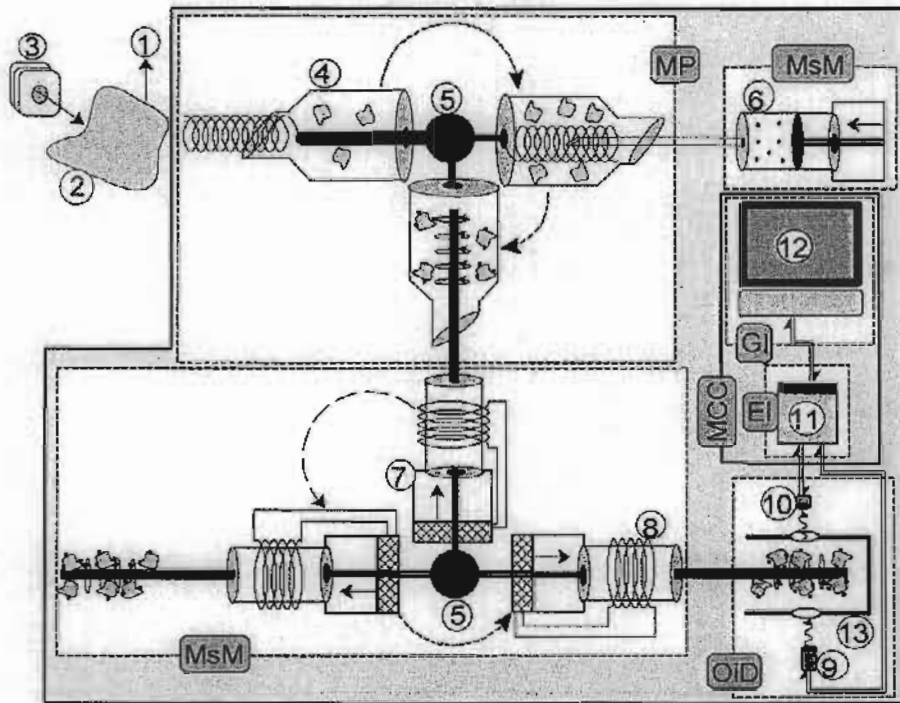


Fig. 3. Diagrama structurală a dispozitivului:

- 1 – flux de probe;
- 2 – aliment;
- 3 – sistem de monitorizare a fluxului de probe;
- 4 – microsistem de prelevare și condiționare;
- 5 – microsistem de poziționare a probelor;
- 6 – microinjector de marcare biochimică;
- 7 – microsondă magnetică;
- 8 – inducitor magnetic;
- 9 – diodă laser;
- 10 – detector;
- 11- interfață electronică;
- 12 – interfață grafică.

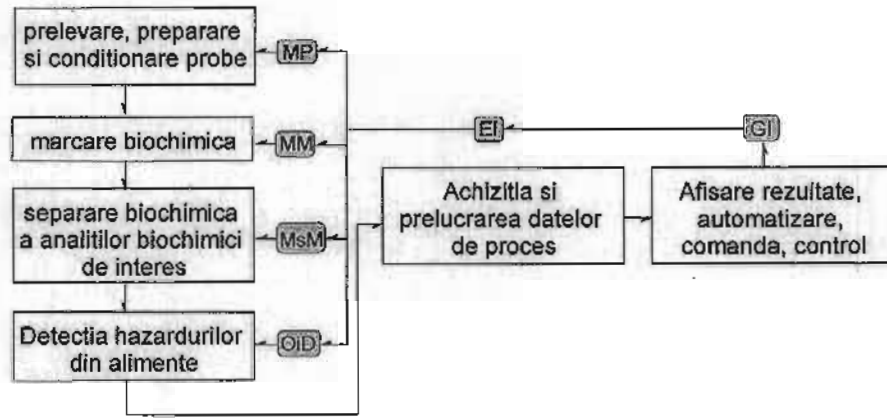


Fig. 4. Fluxul de materiale și informații realizat la nivelul dispozitivului



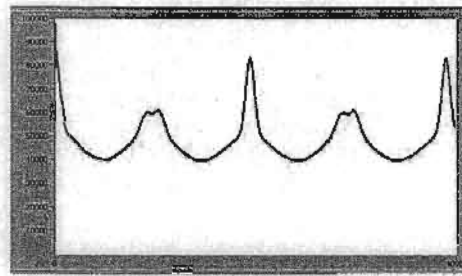


Fig. 5. Spectru de fluorescență specifică achiziționat pe nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  reticulate pe *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*