



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00738

(22) Data de depozit: 27/09/2017

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. 3/2019

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI
RADIAȚIEI, STR.ATOMIȘTILOR NR.409,
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• PALLA PAPAVALU ALEXANDRA,
STR.BARIERA VĂLCII NR.303B, CRAIOVA,
DJ, RO;

• DINESCU MARIA, STR. BĂRCA NR.17,
BL.M8, SC.A, ET.2, AP.17, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• FILIPESCU MIHAELA,
STR.ION NEDELEANU NR.12, BL.P76,
SC.4, AP.97, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ANDREI ANDREEA CARMEN,
STR.PANSELELOR 1, BL.B8, SC.2, AP.18,
MĂGURELE, IF, RO;
• STOKKER CHEREGI FLAVIAN,
STR. FĂINARI 26, BL.50, ET.7, AP.128,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE FABRICARE DE LABORATOARE PE UN CIP PENTRU DETECȚIA DE MICROORGANISME

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de fabricare a unui laborator pe un cip pentru detecția de microorganisme. Metoda conform invenției se desfășoară în două etape: o primă etapă de obținere de microcanale, scrise direct cu laserul, într-un substrat de polidimetilsiloxan, și o a doua etapă de aplicare a unor elemente de încălzire formate din filme subțiri de Ni, depuse prin depunere laser pulsată.

Revendicări: 3
Figuri: 7

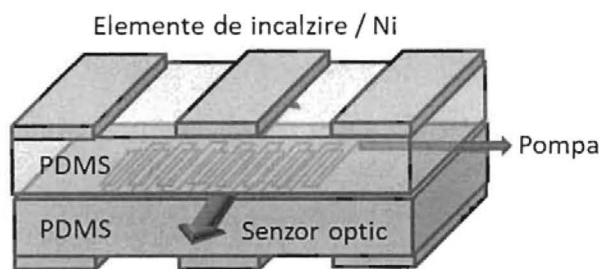
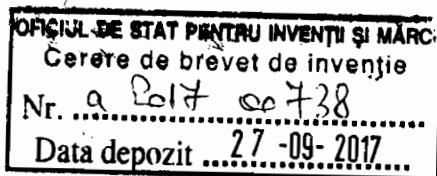


Fig. 1





Descrierea invenției

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a laboratoarelor pe un cip având ca scop detectia de micro-organisme. Aceasta metoda se desfășoară în două etape: 1. Obținerea de microcanale și 2. Obținerea de elemente de încălzire.

Un sistem microfluidic este un dispozitiv format din canale cu dimensiunea secțiunii transversale de ordinul micronilor sau sub-micronica, potrivite pentru manipularea volumelor mici de lichid (10^{-9} la 10^{-18} litri). Pot fi utilizate componente suplimentare, cum ar fi micro pompe, micro valve, și unități de detecție pentru prelucrare (amestecare, separare, concentrare, sinteza) și analiză. Când aceste sisteme complexe se realizează pe un microcip ele se numesc laborator-pe-un-cip sau Micro Sistem de Analiza Totală. În comparație cu sistemele convenționale bine stabilite pentru procesarea și analiza de lichide (de exemplu, bazate pe pipetare automată în combinație cu matrici de microtitrare), principalul avantaj al sistemelor microfluidice este dimensiunea lor compactă, permițând aplicații portabile potrivite pentru analiza rapidă la fața locului. Consumul foarte redus de material analizat este avantajos atunci când se folosesc analiti scumpi. Producția în masă bazată pe compatibilitatea etapelor de fabricație utilizate în mod obișnuit (cum ar fi structurarea polidimetilsiloxan-ului PDMS-ului) ar permite reducerea drastică a costurilor dispozitivului.

Cu toate acestea, aplicațiile sistemelor microfluidice au dat rareori soluții pentru industrializare și lansarea pe piață. Astfel, domeniul sistemelor microfluidice este încă subiect de cercetare academică în ceea ce privește fezabilitatea tehnicii și aplicațiile. Acest fapt este subliniat de literatura recentă de specialitate cu privire la tehnicile de producție, combinațiile de materiale noi, sistemele de detecție și metodele de prelucrare a lichidului și de articolele privind senzori pentru industria alimentară, agricultura, biosenzori și aplicații medicale, precum și senzori pentru monitorizarea mediului. Trebuie menționată o aplicație foarte promițătoare a sistemelor microfluidice, și anume sinteza de biocombustibili.

➤ Obținerea de microcanale

Pentru fabricarea de micro-canale în dispozitivele microfluidice, fasciculul laser este focalizat pe suprafața materialului din care este realizat dispozitivul microfluidic. Dispozitivul este plasat pe o masă de translație xyz ce este conectată la un calculator în care se încarcă un fișier cu modelul ce se dorește a fi scris. Polidimetilsiloxan-ul (PDMS) este un polimer folosit în numeroase aplicații tehnologice și este materialul ales pentru micro-structurare. În figura 2 este prezentată schema procesului laser de scriere a micro-canalor în PDMS. Îndepărtarea materialului cu ajutorul laserului (ablația laser) are loc atunci când intensitatea fasciculului laser este suficient de mare pentru a transforma materialul în plasmă. Rezoluția modelelor „scrise” într-un material este limitată de dimensiunea fasciculului laser cât și de efectele termice și mecanice.

S-a folosit un laser cu ArF (193 nm) cu diferite rate de repetiție a pulsurilor (de la 1 Hz la 50 Hz). Cu toate că PDMS-ul are un coeficient de absorbție redus ($\sim 2\text{cm}^{-1}$) la lungimea de undă folosită (193 nm), este posibilă structurarea lui aplicând fluente laser $< 1\text{ J/cm}^2$. Acest comportament este posibil datorită încălzirii materialului și creșterii coeficientului de absorbție [R. Srinivasan et al. J. Appl. Phys. 68 (1990) și S. Kuper et al. Appl. Phys. A 211 (1989)]. În figura 3 a) este prezentat spectrul de absorbție în UV al PDMS-ului. Incubarea poate avea loc până la câțiva micrometri sub suprafața iradiată laser și se datorează unor modificări chimice, sau transformări chimice locale până la sute de micrometri sub suprafața iradiată laser și poate conduce la o creștere a absorbției la lungimea de undă aleasă.

Am realizat filme de PDMS prin evaporarea unei soluții de 12%wt de vinil-PDMS în isooctan în cutii Petri. După evaporarea solventului, filmele au fost încălzite pentru 5 minute la 100 °C. Grosimea finală a filmelor folosite pentru structurare laser a fost de 400 μm și a fost determinată cu un profilometru Dektak 8000. În figura 3 b) este prezentată o imagine de microscopie de forță atomică (AFM) a suprafeței unui film de PDMS după încălzire.

Pentru a realiza micro-canale în PDMS (de diferite lungimi, lățimi și cu înălțimi variabile), am variat atât distanța dintre două pulsuri consecutive cât și fluența laser. Astfel, păstrând constantă suprapunerea dintre două pulsuri laser consecutive la 50 % și variind numărul de pulsuri laser am obținut micro-canale cu diferite înălțimi, așa cum se poate observa din figura 4, unde sunt reprezentate profilele micro-canelor obținute.

➤ **Obținerea de elemente de încălzire prin depunere laser pulsată**

Fasciculul laser generat de laserul pulsat Nd:YAG "Surelite II" (Continuum Company) este focalizat pe ținta de Ni. Atunci când acest fascicul laser iradiază ținta, se formează o plasmă, iar speciile din ținta de Ni sunt colectate sub forma unui film subțire pe un substrat ce este plasat paralel și la mică distanță de ținta.

În timpul depunerilor, fluența laser (energia laser distribuită pe aria spotului laser) a fost variată (1.5 and 4.8 J/cm²). Ca substrat s-au folosit filme de PDMS plasate la diferite distanțe de ținta. Numărul de pulsuri laser a fost de asemenea variat (36,000 până la 144,000) pentru a obține filme subțiri de diferite grosimi (între 40 nm și 500 nm). Ținta a fost rotită și traslatată în timpul depunerilor pentru a se evita distrugerea acesteia. Filmele subțiri astfel obținute prezintă caracteristicile prezintă caracteristicile sistemului de Ni cubic, și anume reflexiile (111) și (200), care sunt în acord cu PDF # 00-004-0850. Acesta este un prim indiciu că filmele obținute prin PLD sunt de Ni metalic, fără prezența oxidului de Ni care ar putea avea un impact negativ asupra proprietăților lor funcționale.

Elementele de încălzire fost obținute prin aplicarea unei măști pe substratul de PDMS, obținându-se astfel un model de trei benzi identice cu dimensiuni de 13 x 3 mm, cu distanța de 2 mm între benzile adiacente, așa cum este ilustrat în figura 5.

Rezistența electrică a fiecărei benzi din probele obținute în eșantionul prezentat în figura 5 a fost determinată în jurul valorii de 100 de ohmi, o valoare care indică un potențial spre dezvoltarea de elemente de încălzire pentru dispozitivele microfluidice [V. Mirales, A. Huerre, F. Malloggi, M.-C. Jullien, A Review of Heating and Temperature Control in Microfluidic Systems: Techniques and Applications, *Diagnostics* 3, 33 (2013)]. Eșantionul a fost dezvoltat cu scopul specific de a rezolva problemele legate de robustețe, miniaturizarea și ușurința de prelucrare. Prin urmare, acesta a fost supus la zeci de cicluri de îndoire, care nu au provocat o degradare a proprietăților sale electrice. Aceste rezultate indică faptul că filmele subțiri de Ni obținute prin PLD au potențial în direcția integrării în dispozitive microfluidice mai complexe. Pentru aceasta, benzile de Ni obținute prin PLD au fost testate în vederea folosirii lor ca elemente de încălzire integrate în sistemul microfluidic.

Astfel, în figura 6 sunt prezentate imagini de termoviziune ale benzilor de Ni încălzite la temperaturile necesare pentru amplificarea ADN-ului. În plus, în figura 7 este prezentată distribuția temperaturii în

benzile de Ni (aplicând tensiuni de 1-2V pot fi obținute temperaturi de 70-100°C). De asemenea, am observat ca benzile de Ni sunt stabile in timp si nu sunt distruse in urma ciclurilor multiple de încălzire.

Prin aplicarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

- Se obtin micro-canale in PDMS pentru dispozitivele microfluidice
- Se obtin elemente de incalzire prin PLD pe PDMS;
- Se obtine un laborator pe un cip care, prin dimensiunea lui compacta, permite aplicatii portabile potrivite pentru analiza rapida la fata locului

Bibliografie selectiva

1. Kaspar CW et al. Conglutination and enzyme capture tests for detection of *Escherichia coli* beta-galactosidase, beta-glucuronidase, and glutamate decarboxylase. *Appl Environ Microbiol.* 53: 1073–1077, 1987.
2. Cleuziat P et al. Specific detection of *Escherichia coli* and *Shigella* species using fragments of genes coding for beta-glucuronidase. *FEMS Microbiol Letters* 72: 315-322, 1990.
3. Bej AK et al. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol.* 57:1013-1017, 1991.
4. Reischl, U. et al. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *Clin. Microbiol.*, 38:2429–2433, 2000.
5. Frahm E et al. Application of fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J. Microbiol Meth.* 52:123-131, 2003.
6. Huletsky A et al. New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 42: 1875–1884, 2004.
7. Maheux AF et al. Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water Res.* 43: 3019-3028, 2009.
8. Takahashi H et al. Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of *Escherichia coli*. *J Microbiol Meth.* 79: 124-127, 2009.
9. Anbazhagan, D et al. Development of Conventional and Real-time Multiplex PCR Assay for the Detection of Nosocomial Pathogens. *Brazilian J. Microbiol.*, 42 : 448-458, 2011.
10. Clifford RJ et al. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLOS One* 7:e48558, 2012
11. Soederquist B et al. Real-time multiplex PCR for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical samples enriched by broth culture. *Acta Pathol Microbiol Scand* 120: 427–432, 2012.
12. Kim J-Uk et al. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains Suitable in Regions of High MRSA Endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 51(3): 1008-1013, 2013.

13. Furutani S et al. Rapid and highly sensitive detection by real-time polymerase chain reaction using a chip coated with its reagents. *Anal Sciences*. 30: 569-574, 2014.
14. Velasco V et al. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes from Selective Enrichments from Animals and Retail Meat. *PLoSone*. 9(5): e97617, 2014.
15. C.B. Arnold, A. Pique, Laser Direct Write Processing, *MRS Bulletin* Vol. 32, 2007.
16. G.S. Fiorini, D.T. Chiu. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques* Vol. 38, No. 3 42-446, 2005.
17. E. Delamarche et al. Microfluidics for processing surfaces and miniaturizin biological assays. *Advanced Materials* 17, 2911-2933, 2005.
18. N.M. Matos Pires et al. Recent developments in optical detection technologies in lab-on-achip devices for biosensing applications. *Sensors* 14, 15458-15479, 2014.

Revendicari

1. Metoda de fabricare de laboratoare pe un cip pentru detectia de micoorganisme (figura 1).
2. Determinarea parametrilor optimi pentru obtinerea de microcanale pe substraturi de PDMS cu ajutorul laserului.
3. Determinarea parametrilor optimi pentru obtinerea de elemente de incalzire din Ni prin PLD.

Figura 1

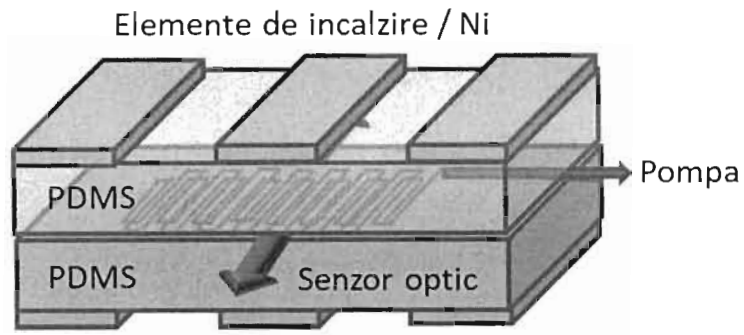


Figura 2

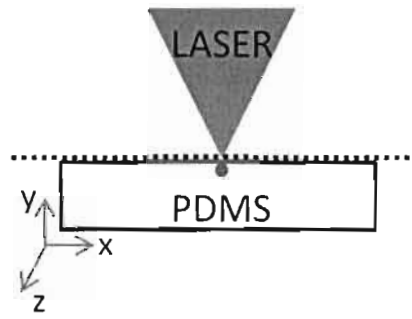


Figura 3a si b

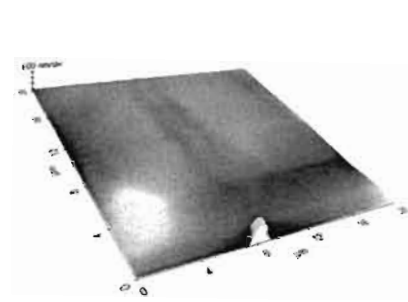
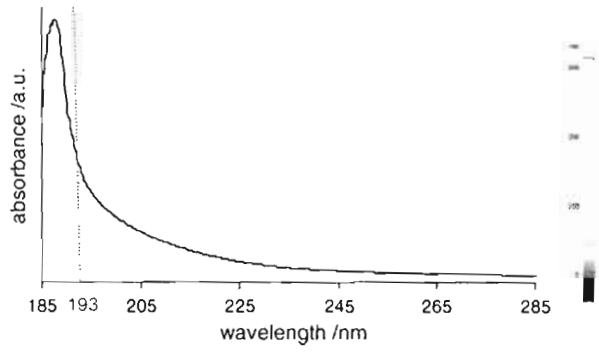


Figura 4

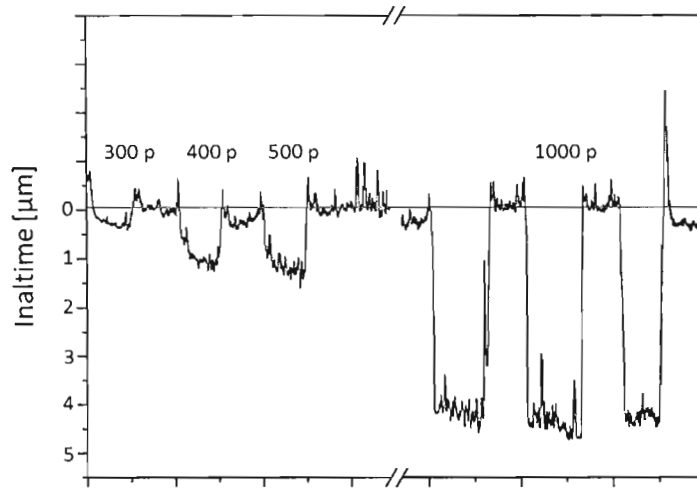


Figura 5

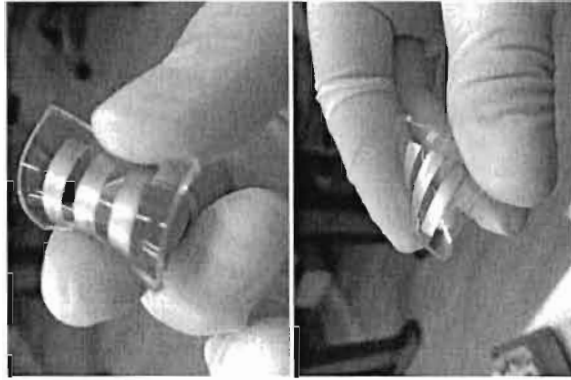


Figura 6

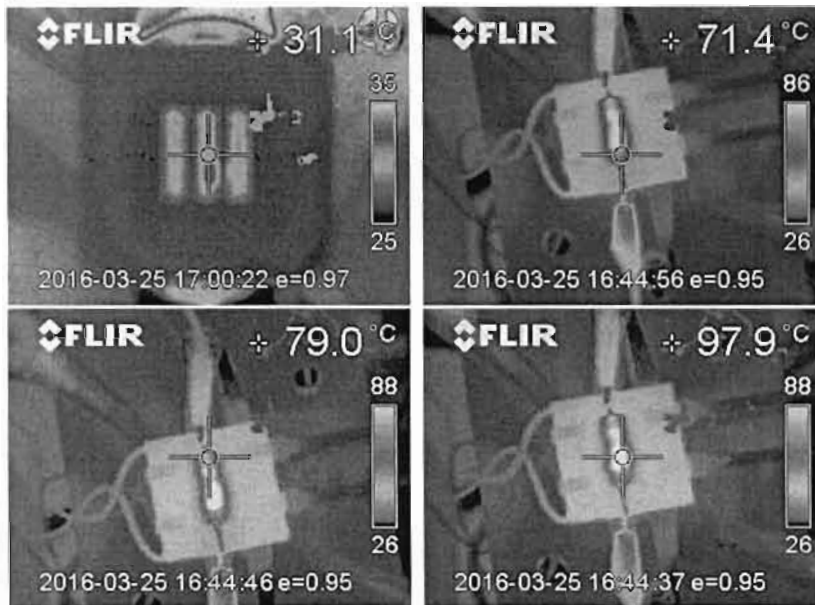


Figura 7

