

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00053

(22) Data de depozit: 31/01/2019

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2019 BOPI nr. 11/2019

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI  
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• CIORIȚĂ ALEXANDRA,  
STR.GHEORGHE DOJA, NR.2, BL.1A, SC.2,  
AP.36, GALAȚI, GL, RO;  
• SURDUCAN VASILE, STR.NUCULUI  
NR.8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• SURDUCAN EMANOIL,  
STR.GHEORGHE DIMA NR.10, AP.19,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) DISPOZITIV FOTOGRAFIC PENTRU OBSERVAREA ÎN TIMP  
REAL A EVOLUȚIEI MATERIALULUI BIOLGIC  
MACROSCOPIC *IN VITRO*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic dintr-un vas (4) Petri sigilat. Dispozitivul conform invenției este alcătuit din două părți identice, fiecare conținând: un aparat (1) fotografic digital montat orizontal pe un suport (2) dotat în partea inferioară cu o oglindă (3) optică poziționată la 45°, un vas (4) Petri care conține materialul (41) biologic de analizat, așezat pe un suport (5) orizontal situat deasupra obiectivului aparatului (1) fotografic și o lampă (6) LED matriceală, transparență la câmp electromagnetic, prevăzută cu un sistem (61) de difuzie, poziționată deasupra vasului (4) Petri astfel încât calea (7) optică a întregului ansamblu trece prin centrul obiectivului aparatului (1) de fotografiat, centrul vasului (4) Petri și centrul lămpii (6), iar aparatul (1) fotografic și lampa (6) sunt alimentate de la o sursă (8) neîntreruptibilă de tensiune joasă, cu două ieșiri (81, 82) separate.

Revendicări: 5  
Figuri: 4

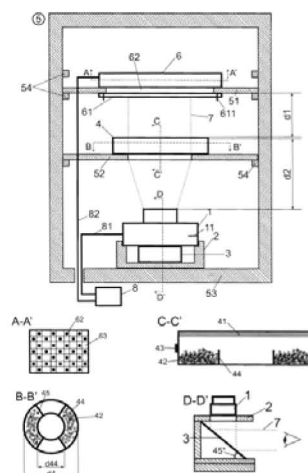
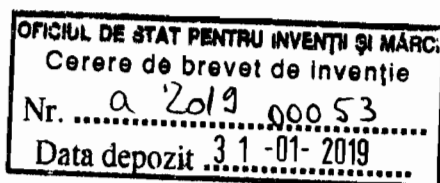


Fig. 1

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).





## Descrierea invenției

### a) Titlu:

Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic microscopic *in vitro*.

Automated photographic device for real-time monitoring of *in vitro* biological samples

### b) Precizarea domeniului tehnic în care poate fi folosită invenția;

Dispozitivul fotografic descris în prezenta invenție este destinat laboratoarelor de cercetare cu specific biologie, medicină, etc. sau în activități generice de cercetare-educație în facultăți. Invenția permite realizarea unui film, prin înlănțuirea unor cadre fotografice luate la intervale bine definite de timp, pe parcursul derulării unui experiment de dezvoltare a unui material biologic (cultură de bacterii, celule etc.) la un preț de cost total al întregului dispozitiv extrem de scăzut. Fiecare cadru realizat conține imaginea unei colonii de celule macroscopice aflat la un moment dat al dezvoltării sale ce poate fi accelerată printr-un catalizator (câmp electromagnetic cu caracteristici precizate, radiație optică cu lungime de undă stabilită) respectiv încetinită datorată acțiunii unui inhibitor (antibiotic, anticancerigen, etc.).

### c) Indicarea stadiului anterior al tehnicii și indicarea documentelor care stau la baza acestuia;

Stadiul anterior al tehnicii permite monitorizarea în timp real și de lungă durată a probelor biologice *in vitro* oferind operatorului imagini în baza cărora să poată interpreta rezultatele. Conform **US2009/0086314 A1** speciemenle biologice sunt monitorizate în fluorescență, aspect diferit față de invenția de față. Pentru a putea surprinde modificările apărute în celule este necesară observarea îndelungată a acestora, asemeni problemei soluționate de noi, operațiune ce poate duce la consumarea fluorescenței, iar **US2009/0086314 A1** evită acest risc. Imaginea fluorescentă este obținută folosind o cameră CCD cu intensitatea luminoasă ajustabilă. **ES2014/2656681 T3** dezvoltă o tehnică automată de microscopie prin care este monitorizat specimenul biologic, în special bacterii, în timp real, pe măsură ce acesta interacționează cu diverși stimuli (mediu de cultură) sau inhibitori (antibiotice), rezultatul fiind redat sub formă de imagini pe care operatorul le poate interpreta ulterior, ca și în cazul invenției de față. Dintre brevetele de invenții analizate, cel mai apropiat de invenția de față este **GB2013/2494202 A** care descrie un dispozitiv asemănător prin aceea că: specimenul biologic poate fi observat în mod automat în timp

real prin intermediul unui dispozitiv de fotografiat; elimină problema condensului în vasul în care se află specimenul biologic prin încălzirea controlată a acestuia; conține o sursă de iluminare; monitorizează temperatura și umiditatea mediului.

În ceea ce privește toate invențiile descrise anterior, acestea nu pot fi utilizate în prezența stimulilor/inhibitorilor de tipul radiațiilor electromagnetice neionizante (microunde), în momentul în care acestea acționează asupra specimenului biologic. Experimentul trebuie să decurgă în condiții controlate de frecvență și intensitate a câmpului electromagnetic, temperatură și umiditate, într-o incintă anechoică special concepută care să permită păstrarea acestor parametri pe toată durata experimentului. Echipamentele descrise în **US2009/0086314 A1** și **ES2014/2656681 T3** sunt mult prea voluminoase și nu pot fi introduse în incinte. Deși problema dimensiunilor prea mari este eliminată în **GB2013/2494202 A**, echipamentul utilizat ar duce la modificarea distribuției unui câmp electromagnetic iradiant datorită materialelor componente ale dispozitivului.

**d) Expunerea invenției în termeni care să permită înțelegerea problemei tehnice și a soluției așa cum este revendicată precum și avantajele invenției în raport cu stadiul anterior al tehnicii;**

Pentru a putea analiza efectul unui catalizator (o substanță, o radiație termică sau electromagnetică) sau al unui inhibitor (un antibiotic sau un anticancerigen) asupra unei colonii de celule (bacterii, celule epiteliale etc.) este necesar: (i) realizarea unui preparat ce conține de regulă un substrat de hrănire a celulelor cu agenți antimicotici și aplicarea acestuia în vasul Petri, (ii) însămânțarea coloniei, (iii) păstrarea ansamblului la temperatură controlată, (iv) introducerea catalizatorului sau a inhibitorului în concentrații cunoscute pe o suprafață bine delimitată a coloniei și (v) observarea evoluției dezvoltării/inhibării coloniei de celule la intervale de timp precise, cu un microscop optic. Acest procedeu necesită prezența permanentă a unui operator uman perioade de timp de 24-72 de ore sau achiziția unui microscop special cu sistem automatizat de achiziție a imaginilor. Există experimente în care colonia de celule trebuie iradiată cu câmp electromagnetic la diferite frecvențe și puteri specifice experimentului. În această situație creșterea coloniei de celule are loc în incinte anechoice închise, unde este imposibilă introducerea unui microscop deoarece acesta fie nu încapă, fie produce obturarea și/sau unde staționare câmpului electromagnetic iradiant făcând experimentul incontrolabil. Pe de altă parte substratul de cultură conține apă. Aceasta se evaporă pe durata creșterii celulelor și condensează pe capacul interior al vasului Petri. Condensul împiedică realizarea unei imagini fotografice clare. În această situație o soluție viabilă este utilizarea

dispozitivului din invenția de față în care configurația căii optice și prezența unor absorbanți ai umidității pe bază de silicagel în vasul Petri (fără a contamina cultura) reduc substanțial volumul picăturilor de condens din calea optică permițând focalizarea imaginii pe colonia de celule. **Avantajele invenției de față sunt:** automatizarea obținerii imaginilor fotografice pe întreaga durată de creștere a coloniei celulare fără a fi nevoie de un operator permanent, creșterea calității imaginii prin eliberarea de condens a căii optice din vasul Petri fără a utiliza surse de încălzire, posibilitatea iradierii în câmp de microunde a probei pe întreaga durată a experimentului, spre deosebire de soluția din cel mai apropiat brevet **GB2013/2494202 A**, în care: condensul este eliminat prin încălzire și ventilare; sursa de iluminare este amplasată sub vasul în care se află specimenul biologic iar dispozitivul de iluminat este format din tuburi de neon. În această configurație este imposibilă aplicarea unui câmp electromagnetic uniform distribuit asupra specimenului biologic. Acest aspect este corectat prin invenția de față în care sistemul de iluminare cu LED-uri permite propagarea câmpului electromagnetic iar amplasarea aparatului fotografic sub vasul Petri permite preluarea automată de imagini.

#### **e) Prezentarea pe scurt a desenelor explicative**

Fig.1 reprezintă schema optică și de amplasare a dispozitivului fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic *in vitro*.

Fig.2 reprezintă un exemplu de aplicare a dispozitivului în două incinte anechoice: stânga iradiere câmp electromagnetic, dreapta referință.

Fig.3 reprezintă imagini obținute cu dispozitivul la momente diferite de timp pe o cultură de *E.coli* în incinta de referință, respectiv imagini obținute în incinta de iradiere cu câmp electromagnetic, fără material (42) absorbant de umiditate în vasul (4) Petri.

Fig.4 imagini obținute cu dispozitivul din prezenta invenție la momente diferite de timp pe o cultură de *E.coli* în incinta de referință, respectiv imagini obținute în incinta de iradiere cu câmp electromagnetic, cu material (42) absorbant de umiditate în vasul (4) Petri.

#### **f) Expunerea detaliată a invenției pentru care se solicită protecția**

Invenția se referă la două dispozitive fotografice identice pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic *in vitro*, unul se amplasează în incinta de referință, iar celălalt în incinta de observație a experimentului propriu-zis. Din punct de vedere constructiv, fiecare dispozitiv este alcătuit conform fig.1 dintr-o incintă închisă (5)

realizată dintr-un material izolator termic în care sunt dispuse (enumerarea începând dinspre bază înspre partea superioară) următoarele elemente: un aparat fotografic digital (1) așezat într-un suport (2) ce înglobează perfect aparatul fotografic (1) astfel încât acesta nu se mișcă la atingerea lui, suport (2) în care este montată la 45° față de orizontală o oglindă optică (3) astfel încât imaginea fotografică vizibilă pe afișajul cu cristal lichid al aparatului fotografic este proiectată spre ochiul operatorului, conform secțiunii D-D', fig.1. În calea optică (7) a aparatului fotografic, la înălțimea  $d_2$  se află un vas (4) Petri din material plastic transparent, având diametrul  $d_4$ , așezat gravitațional pe un suport (52) tip raft, montat perfect orizontal, realizat din același material ca și incinta (5), în care este decupat un orificiu având un diametru cu cca. 10% mai mic decât al vasului (2) Petri. Vasul Petri este așezat cu stratul de material biologic (41) înspre sursa de lumină și cu capacul înspre aparatul fotografic (1) conform secțiunii C-C', fig.1. La intersecția a două diametre  $d_4$  trasate pe vasul Petri se marchează un punct contrastant pe exteriorul capacului conținând materialul biologic. În interiorul vasului (4) Petri se amplasează o rondelă (44) având diametrul  $d_{44}$  și înălțimea cca. 70% din grosimea vasului Petri, conform secțiunii B-B', fig.1, rondelă (44) realizată dintr-un material ce poate fi sterilizat la 120°C. Rondela (44) se amplasează și se manevrează în vasul (4) Petri astfel încât să nu ajungă în contact direct cu materialul biologic (41). Rondela (44) se distanțează de pereții exteriori ai vasului (4) Petri prin patru distanțoare (45) realizate din același material ca și rondela (44), fixate mecanic de rondelă fără adeziv. În spațiul liber dintre pereții vasului (4) Petri și rondelă ( $d_4$ - $d_{44}$ ) se amplasează în două alveole rezultate, un amestec de perle de silicagel (42) uniform distribuite conținând și granule de silicagel impregnate cu marker de culoare. Vasul (4) Petri astfel preparat este sigilat cu parafilm (43). Vasul (4) Petri este iluminat uniform cu o lampă (6) realizată din bandă de LED-uri conform detaliului A-A', fig.1, astfel încât suprafața de iluminare este formată din goluri (63) și LED-uri (62), intercalate uniform. Lampa cu LED-uri (6) este montată deasupra unui al doilea raft (51) situat la distanța  $d_1$  față de planul conținând materialul biologic (41) din vasul (4) Petri, într-o deschidere pătrată (62) realizată în raft având latura de aproximativ 1.6 ori mai mare decât diametrul de vizare util ( $d_{44}$ ) din vasul Petri. Pe partea inferioară a raftului (51) este montat un element de difuzie (61) al luminii generate de benzile cu LED-uri. Atât lampa (6) cu LED-uri cât și aparatul fotografic digital (1) sunt alimentate dintr-o sursă de tensiune joasă, neizomotoasă electric și neîntreruptibilă (alimentarea primară provenită de la o sursă de 220V de tip UPS). Cardul SD (11) al aparatului fotografic (1) se înscrie cu un sistem auxiliar de operare al aparatului fotografic (CHDK sau similar) și cu un script software ce realizează funcția de intervalometru. Intervalometrul este dispozitivul ce

declanșează aparatul fotografic în mod repetat la intervale de timp egale programabile. Înainte de a monta aparatul fotografic (1) în suportul său (2) acesta se pornește și se programează rata de declanșare, regimul macro, regimul și timpul de expunere, sensibilitatea, diafragma, nivelul de mărire analogic cât și temperatura, de culoare definită de utilizator și corectată inițial pentru tipul de iluminare din cutia (5). Apoi se declanșează funcția de intervalometru și aparatul fotografic se montează în suportul (2) astfel încât zona activă a coloniei de celule cuprinsă în interiorul diametrului  $d_{44}$  să umple întreaga imagine. Punctul de referință marcat la intersecția a două diametre  $d_4$  ale vasului (4) Petri trebuie să fie situat în centrul imaginii observate în oglinda (3) și această aliniere se realizează din suportul (2) care se poate deplasa în planul XoY pe fundul (53) al cutiei. La nevoie distanța  $d_2$  se ajustează utilizând rafturi suplimentare de aceeași grosime care se amplasează sub suportul (2). Distanța  $d_1$  se poate ajusta prin mutarea raftului (51) utilizând suporturile (54) ale acestuia.

**Un exemplu de realizare** al dispozitivului fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic microscopic *in vitro* este prezentat în imaginile din fig.2. Cele două cutii (5) au dimensiunile exterioare de 580x450x540mm [lungime-lățime-înălțime] sunt realizate din polistiren extrudat de înaltă densitate cu grosimea de 20mm prin tehnologia nut și feder fără a utiliza adeziv. Cutiile sunt amplasate în două incinte anechoice Comtest Engineering BV realizate la comandă, cu atenuarea undei plane în domeniul 30MHz-10GHz de min.110dB. Aparatele fotografice digitale (1) utilizate au fost Canon SX160IS echipate cu card SD de 8GB și sistem de operare suplimentar CHDK. Setările aparatelor fotografice au fost: funcționare în mod manual, ISO100, diafragmă F8, timp de expunere 1/30, regim macro, balans de alb particular pre-setat inițial, rezoluția imaginii 4608x3456 pixeli, cu tipărirea datei și orei, realizarea unei imagini la interval de 10min. Suporturile (2) aparatelor fotografice au dimensiunile de 130x70x65mm și sunt realizate din același material ca și cutia (5). Oglinzile optice (3) amplasate în fiecare suport (2) în două canale laterale, au dimensiunile de 100x70mm și grosimea de 2mm. Distanțele din planul optic sunt  $d_2=30\text{mm}$  și  $d_1=150\text{mm}$ . Lampa LED (6) utilizată are un număr de 9x9 panglici cu LED având temperatura de culoare de 3300K (alb cald) respectiv 4000K (alb rece), intercalate uniform pe o suprafață dielectrică de 150x150mm. Sursa de alimentare (8) utilizată este de tip liniar cu două tensiuni de ieșire: 3V/3A pentru aparatele fotografice (1) respectiv 12V/2A pentru lămpile LED (6).

Materialul biologic (41) a fost pregătit astfel: mediul de cultură nutrient agar 2% turnat cu cel mult 24 de ore înainte într-un volum de ~25 mL, a fost inoculat cu materialul biologic

(41), într-un vas (4) Petri cu diametrul  $d_4$  de 100 mm din plastic de unică folosință, steril, în condiții de asepsie. Materialul biologic (41) a constat în culturi de *Escherichia coli* ATCC 25922 de 24 de ore, inoculat conform normelor ISO 10993-5:2009. Înainte de inoculare, pe capacul plăcii Petri (4) au fost montate rondela (44) având  $d_{44} = 90$  mm față și distanțoarele (45) și adăugate 25 g de silicagel (42), astfel încât spațiul ocupat de acesta să nu intre în contact cu spațiul ocupat de mediul de cultură, pentru a evita limitarea zonei de creștere a bacteriilor, contaminarea sau obturarea căii optice. Totul a decurs într-o hotă cu flux laminar, în condiții sterile și lăsate în prezența UV pentru 10 minute, pentru a evita orice suspiciune de contaminare. După inoculare cu suspensie bacteriană (44), placa (4) a fost izolată cu parafilm (43) pentru a reduce cât mai mult riscurile de contaminare. A fost pregătit material biologic în două vase Petri pentru referință și iradiere. În incinta de referință (fig.2) colonia a crescut în lipsa oricărui factor catalizator, în incinta de experiment colonia a fost supusă unei iradiere continue cu câmp electromagnetic în domeniul de frecvențe 2.42-2.49GHz cu o putere medie de -6dBm (densitate locală de putere de  $90\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) provenite dintr-un router Dlink model DI524 prin antena baston proprie routerului. Routerul a fost amplasat pe capacul superior al incintei (5), iar antena baston a intrat în incinta (5) printr-un orificiu cu diametru de 10mm situat în centrul capacului superior. Temperatura și umiditatea din incinte au fost monitorizate cu două dataloggere tip DS100 pe întreaga durată a experimentului. Fig.3 prezintă evoluția dezvoltării coloniei de bacterii din incinta de experiment la trei momente de timp diferite situate în intervalul de 72 de ore de experiment. Un număr de cca. 430 de cadre similare ca dimensiune, dar diferite ca și conținut cu cele trei prezentate în fig.3 au fost memorate pe cardurile (11) ale aparatelor fotografice (1) la intervale de 10min. Cadrele au fost ulterior înlănțuite într-un film utilizând un calculator personal PC, film pe care se pot observa momentele esențiale ale evoluției coloniilor de bacterii.

## Bibliografie

1. Imaging apparatus and methods, Prior Frank, GB2494202 A, 06.03.2013.
2. Automatic method for observing the growth of cell cultures, Dröge Marc, Müller Christian, Linnemann Anja, Mathis Peter H., Borbe Stefan, Heup Torsten, Pippow Andreas, ES2656681T3, 04.10.2014.
3. Biological specimen imaging method and biological specimen imaging apparatus, Namba Akihiro, Suzuki Hirobumi, US2009/0086314 A1, 02.04.2009.

## Revendicări

1. Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic **caracterizat prin aceea că** este replicat de două ori pentru a compara din punct de vedere experimental efectul unor stimuli/inhibitori asupra unui material biologic (41), fiecare replică fiind alcătuită din (fig.1): aparat fotografic (1) digital montat orizontal pe un suport (2) dotat în partea inferioară cu o oglindă (3) optică la 45°, un vas Petri (4) ce conține materialul biologic (41) de analizat așezat pe un suport (52) orizontal situat deasupra obiectivului aparatului fotografic (1) și o lampă LED matricială (6) formată din LED-uri (62) și spații libere (63), cu sistem de difuzie (61) fixat (611) de suportul orizontal (51), LED-urile fiind montate individual sau în panglică pe un suport dielectric transparent la câmp electromagnetic și având orice lungime de undă sau temperatură de culoare, lampă (6) poziționată deasupra vasului (4) Petri astfel încât calea optică (7) a întregului ansamblu să treacă prin centrul obiectivului aparatului de fotografiat (1), centrul vasului (4) Petri și centrul lămpii LED (6), aparatul fotografic (1) și lampa LED (6) fiind ambele alimentate dintr-o sursă (8) neîntreruptibilă de tensiune joasă cu două ieșiri separate (81) respectiv (82), iar imaginile memorate pe cardurile (11) aparatelor fotografice (1) sunt analizate ulterior în mod comparativ cu un program software ce rulează pe calculator.
2. Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** distanța ( $d_1$ ) între obiectivul aparatului de fotografiat (1) și materialul biologic (41) din vasul Petri (4) respectiv distanța ( $d_2$ ) între vasul Petri (4) și lampa LED matricială (6) sunt reglabile astfel încât imaginea preluată de aparatul fotografic (1) configurat în mod imagine macro să prezinte o imagine relevantă pentru orice material biologic (41) macroscopic analizat.
3. Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic conform cu revendicările 1 și 2, **caracterizat prin aceea că** vasul (4) Petri, închis etanș (43) pentru a nu contamina echipamentul, conține un reper de focalizare marcat în exterior pe fundul vasului (4) iar în interior un material absorbant (42) al umidității situat în capacul vasului (4), material absorbant (42) delimitat de o rondelă (44) cu diametru ajustabil ( $d_{44}$ ) astfel încât calea optică (7)



să nu fie obturată și materialul absorbant (42) să nu contamineze materialul biologic (41) situat în calea optică (7).

4. Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic conform cu revendicările 1, 2 și 3, **caracterizat prin aceea că** aparatului fotografic (1) i se rescrie la prima pornire sistemul de operare cu un software ce provine de pe cardul propriu de memorie (11) de unde rulează un program cu funcția de intervalometru programabil, aparatul fotografic (1) se menține apoi pornit pe întreaga durată a experimentului și preia imaginile pe același card (11) cu rata programată în intervalometru, imaginile fiind apoi copiate și înlănțuite cadru cu cadru într-un film prin intermediul unui software ce rulează pe un calculator.
  
5. Dispozitiv fotografic pentru observarea în timp real a evoluției materialului biologic macroscopic conform cu revendicările 1, 2, 3 și 4 **caracterizat prin aceea că** vasul Petri (4) utilizat are un diametru (d4) și este din material plastic de unică folosință, fiind montat în calea optică (7) cu partea semitransparentă ce conține materialul biologic (41) în apropierea sursei LED (6) și cu capacul sprijinit pe suportul (52) în apropierea obiectivului aparatului fotografic (1), astfel încât vasul (4) este traversat atât de lumina provenită de la sursa LED (6) cât și de câmpul electromagnetic iradiat de o antenă (9) amplasată deasupra sursei (6) de iluminat.

Desene explicative

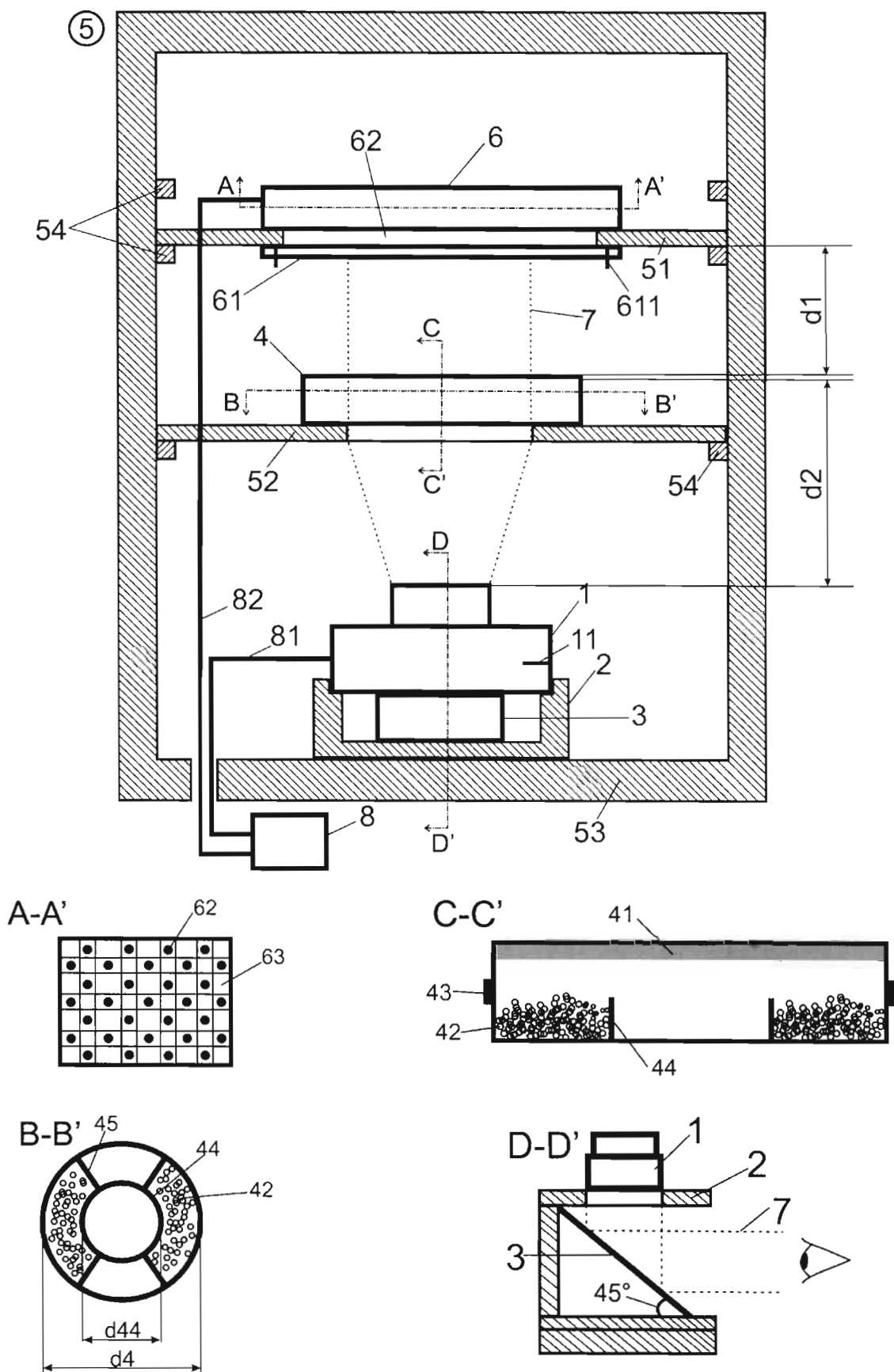


Figura 1.

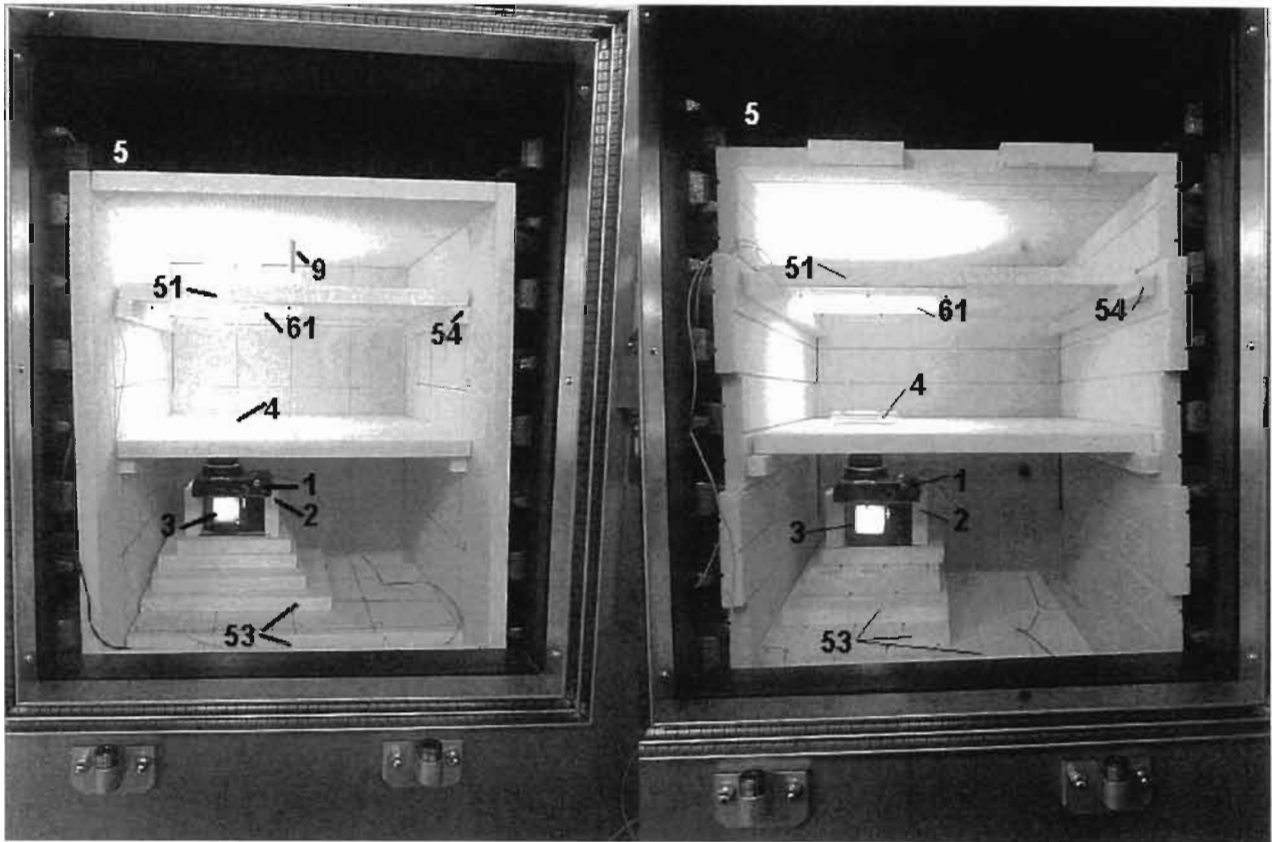


Figura 2.

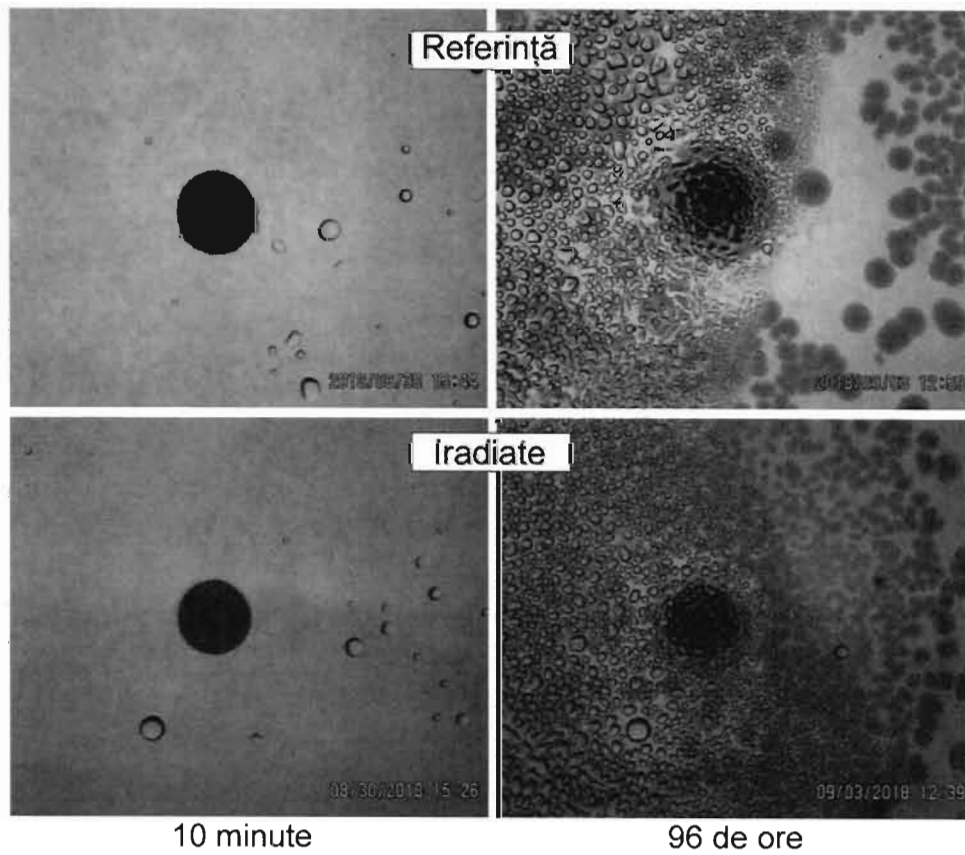


Figura 3.

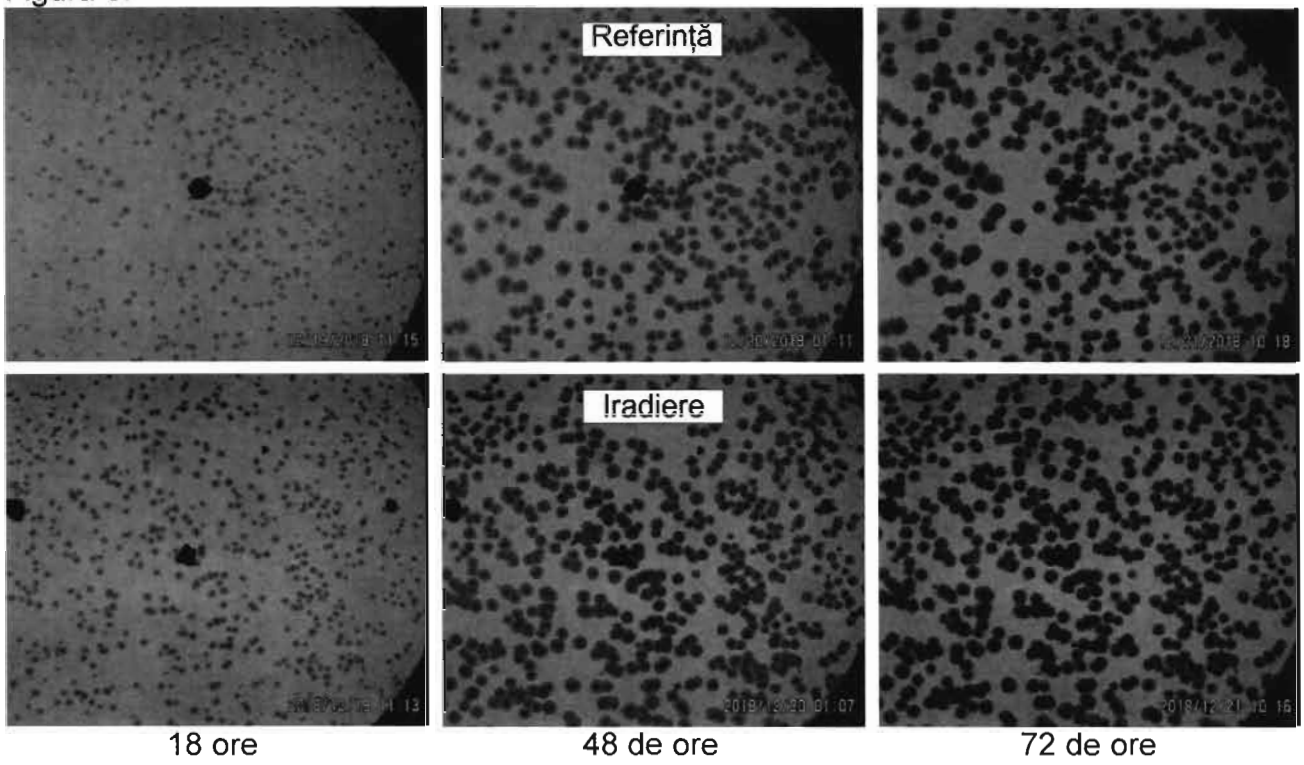


Figura 4.