

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00317**

(22) Data de depozit: **04/06/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2020 BOPI nr. **12/2020**

(71) Solicitant:
• **BANCIU DANIEL DUMITRU,**
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR. 15, BL. 9,
SC. C, AP. 107, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BANCIU ADELA,**
BD. DIMITRIE CANTEMIR, NR. 15, BL. 9,
SC. C, AP. 107, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(72) Inventatori:
• **BANCIU DANIEL DUMITRU,**
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR. 15, BL. 9,
SC. C, AP. 107, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BANCIU ADELA,**
BD. DIMITRIE CANTEMIR, NR. 15, BL. 9,
SC. C, AP. 107, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) PROCEDEU ȘI DISPOZITIV PENTRU ANALIZA *IN VITRO* DIGITALĂ CODIFICATĂ SPAȚIAL A COMPLEMENTARITĂȚII

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu și un dispozitiv pentru analiza *in vitro* digitală codificată spațial a complementarității, de exemplu, pentru detecția și cuantificarea antigenelor, anticorpilor sau a secvențelor de material genetic. Dispozitivul, conform invenției, utilizează o amprentă într-o suprafață deformabilă ce se corelează cu dimensiunea elementului testat, precum și a competitorului utilizat cu o concentrație cunoscută.

Revendicări: 10

Figuri: 4

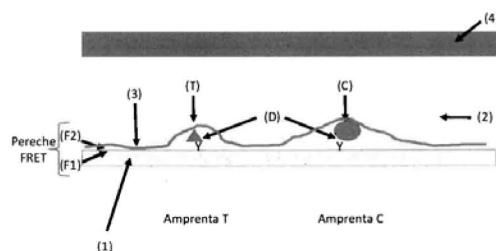
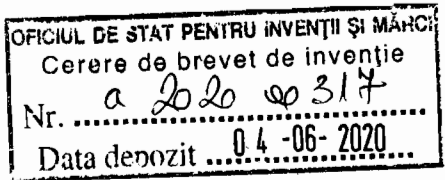


Fig. 3



DESCRIEREA INVENTIEI



a) Titlu inventiei:

Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii

b) Precizarea domeniului tehnic in care poate fi folosita inventia

Inventia se refera la un procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, destinat detectiei si cuantificarii complementaritatii, cum ar fi dar nelimitativ, detectia si cuantificarea antigenelor, anticorpilor sau a secventelor de material genetic. Aplicatiile stiintifice includ reactii de cuantificare a anticorpilor, antigenelor, secvente de material genetic, interactii intre proteine si interactii intre proteine si diverse structuri (cum ar fi material genetic sau structure lipidice).

c) Prezentarea stadiului tehnicii in domeniul obiectului inventiei, cu indicarea documentelor care stau la baza acesteia

Este cunoscut ca testele de complemenataritate pot detecta antigene, anticorpi sau secvente de material genetic printr-o varietate mare de metodologii, pornind de la testul ELISA [1] pana la analize microarray [2, 3]. Principiile de evaluare a reactiei de complementaritate se bazeaza de obicei pe metode imagistice directe sau fluorescente [4]. Necesitatea diagnostica este importanta in epoca noastra, dar in plina schimbare datorita presiunilor sociale, economice [5] si de distantare sociala [6] secundara riscurilor infectioase. Supplimentar, este necesara existenta unor metode economice si flexibile de adaptare la noile necesitati de testare in-vitro datorita mutatiilor si selectiilor genetice [7]. Acestea permit aparitia de noi patogeni ce trebuie testati fiabil, flexibil si accesibil pentru populatie. In plus, presiunea rezistententei la antibiotice dezvolta o presiune etica in administtrarea antibioticelor cu realizarea dezideratului de

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Stancu".

administrare a antibioticului cel mai puțin agresiv față de microorganism dar încă eficient (pentru evitarea apariției și transmiterii rezistenței multiple la antibiotice), în contrast cu dezideratul de tratare eficientă a pacienților [8]. Această testare a rezistenței la antibiotice se poate realiza prin metode qPCR, datorită existenței de informații privind genele de rezistență la antibiotic [9]. Principalul dezavantaj al metodelor fluorescențe este reprezentat de necesitatea de a măsura fluorescența cu o precizie ridicată, datorită intensității reduse a semnalului fluorescent. Dezavantaje metodelor prezentate pentru teste multiple sunt reprezentate de complexitatea dispozitivelor de testare, dimensiunile mari ce fac imposibilă mutarea acestora, și costurile asociate, cu limitare în funcție de costuri sau de existența a echipamentelor a accesibilității în scop medical, industrial sau științific. Secundar accesibilității reduse, în caz de pandemie se pot mobiliza dificil resurse diagnostice suplimentare necesare asocierii funcționării economiei cu o detecție de tip screening în masă repetat periodic în vederea eficientizării distanțării sociale moderate. Un alt dezavantaj al metodelor prezentate este un grad redus de detecție și corecție de erori.

d) Precizarea problemei tehnice (scopul invenției)

Scopul invenției este de scădere a complexității dispozitivelor de testare și cuantificare pentru teste multiple de complementaritate (de tipul antigen, anticorp, secvența specifică de material genetic), scăderea complexității dispozitivelor de testare și a dimensiunilor acestora, cu o scădere a costurilor și creștere a accesibilității acestora.

Un alt obiectiv al invenției este creșterea preciziei și corecția internă de erori, la o folosire de către un personal mediu instruit în utilizarea dispozitivului.

e) Expunerea inventiei in termeni care sa permita intelegerea problemei tehnice si a solutiei asa cum este revendicata precum si avantaje inventiei in raport cu stadiul anterior al tehnicii

Problema pe care o rezolva inventia este reprezentat de amplificarea semnalului fluorescent prin cresterea suprafetei de detectie pentru un singur complex de detectie (cum ar fi antigen-anticorp), si consecutiv a numarului de perechi de fluorofori FRET (cu cateva ordine de marime) comparativ cu metodele uzuale, prin utilizarea amprentei pe care o lasa perechea de detectie (cum ar fi antigen-anticorp), pe o suprafata deformabila. Detectia cu precizie a acestei amprente se realizeaza prin metode de fluorescenta (FRET sau de stingere a fluorescentei) datorita capacitatii FRET de a masura distante de ordinul nanometrilor (la care se obtine o astfel de fluorescenta). Prin utilizarea amprentei pe o suprafata deformabila, se pot masura fluorescent un numar ridicat de fluorofori asociati acesteia (sau a spatiului din jurul amprentei), in loc de masurare a fluorescentei unei singure perechi de fluorofori. De exemplu, daca amprenta unui antigen este mai mare in diametru cu 5 micrometri comparativ cu dimensiunile antigenului, si densitatea de fluorofori este de 500 fluorofori mi micron patrat, avem o suprafata (πr^2) de 19,6 micrometri ce contine 9800 de fluorofori. In acest caz, avem o amplificare a semnalului de aproape 4 ordine de marime a semnalului (9800 fata de 1). In acest caz, este suficienta utilizarea unui sistem optic (camera optica, sistem de lentile si filtre) cu o eficienta cuantica mai buna de 0.1%, si datorita posibilitatii de a utiliza timp de expunere mari (de ordinul secundelor) se poate folosii o camera foto a unui telefon mobil (ce costa pana in 500 de euro) comparativ cu sistemele optice necesare detectiei de matrici de fluorescenta (ce au costuri de aproape 1000 de ori mai mari). Utilizarea de elemente de calibrare (de exemplu microsferice ce au pe suprafata antigene asemanatoare celor de testat) poate duce la o crestere a suprafetei amprentei (similar cu cea pentru antigene) cu o detectie facila a diferentei dintre antigene si controlul de concentratie cunoscuta, cu calcularea facila a concentratiei antigenului

de masurat. In aceste fel se poate creste precizia de masurat simultan cu scaderea costului de analiza intr-o maniera ce permite (din punct de vedere al costurilor si preciziei) analiza de tip detectie repetata in masa de multiple elemente patologice (cum ar fi infectii) si fiziologice (cum ar fi perioadele fertile) cu scaderea costului general al asigurarii starii de sanatate a populatiei. Acest screening in masa repetat periodic se poate realiza inclusiv portabil (sau in cabinetul fiecui medic de familie), datorita scaderii complexitatii si secundar a dimensiunii dispozitivelor de citire, cu o crestere suplimentara a accesibilitatii. Dimensiunile si costurile foarte reduse, pot face acest dispozitiv utilizabil si cu o pregatire medie, daca analiza datelor se realizeaza centralizat, de tip inteligenta artificiala, punand la dispozitia cadrelor medicale si a sistemelor de sanatate o situatie la zi in functie de istoricul personal si evolutia epidemiologica.

Problema pe care o rezolva inventia este de realizare a unui dispozitiv de detectie si cuantificare digitala pentru elemente de complementaritate, cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi, secvente genetice, avand multiple sisteme de corectii de erori, intr-o maniera simplificata constructiv, care sa permita o flexibilitate ridicata in utilizare, precum si costuri asociate mici pentru o accesibilitate ridicata (produs si procedeu). De exemplu, intr-un spatiu delimitat al senzorului se detecteaza antigene, pentru identificarea si cuantificarea patogenilor sau a semnalizatorilor solubili (cum ar fi hormonii); in alt spatiu delimitat al senzorului se detecteaza anticorpii, pentru identificarea si cuantificarea imunitatii (cum ar fi dupa expunere sau dupa vaccinare); si in alt spatiu delimitat se detecteaza secvente de material genetic pentru cunatificarea infectiilor virale, rezistentei la antibiotice (asociata cu secvente cunoscute) sau a diferitelor gene asociate persoanei (pentru evaluarea riscului genetic sau identificarea cu precizie a persoanei pentru evitarea erorilor terapeutice). Aceasta compartimentalizare este necesara pentru a evita reactiile incrucisate (intre antigenele si anticorpii din ser de exemplu) sau pentru necesitatea de tratament preliminar distinct (de extragere a materialului genetic).

Produsul este reprezentat de o structura de tip stratificat (sandvis) constand din :

- (1). Structura partial nedeformabila transparenta pe suprafata careia sunt dispuse
 - o relativ uniform elemente de detectie imagistica, cum ar fi dar nelimitativ, fluorofori dintr-o pereche FRET (F1)
 - o intr-o matrice elementele de detectie (D), cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi, secvente de material genetic
- (2). Spatiul de reactie subtire de tip microfluidic
- (3). Suprafata deformabila
 - o Ce poate fi o membrana subtire deformabila, elemente vascoelastice, de asigurare a unei tensiuni superficiale
 - o Avand elemente de detectie imagistica, cum ar fi dar nelimitativ, fluorofori dintr-o pereche FRET (F2)
 - o Ce poate colaba spatiul de reactie (2) si ajunge in contact cu structura partial nedeformabila (la aplicarea unor forte externe)
 - o Ce poate realiza fluorescanta de tip FRET la contactul dintre fluorofori (F1 si F2)
 - o Ce se poate deforma la colabarea spatiului de reactie (2) la prezenta de elemente fixate de detector (D)
 - o Avand o deformare dependenta de dimensiunea elementelor si a fortelor alicate asupra suprafetei deformabile
- (4). Sistem de aplicare presiune asupra suprafetei deformabile
 - o Ce poate fi de tip recipient cu presiune in gaz pentru uniformitatea presiunilor exercitate asupra suprafetei deformabile (3).
- (5). Recipient ce cantine solutia/suspensia de calibrare (SC) avand o concentratie cunoscuta de competitor (C)
- (6). Sistem de recoltare proba (P) si prelucrare preliminara
 - o De exemplu pentru fluidificarea probelor de puroi

- De exemplu pentru extractia acizilor nucleici
- (7). Sistem de amestecare echivolumica (sau in raport volumetric cunoscut) a solutiei/suspensiei de calibrare (SC) si a probei (P) si de injectare in spatiul de reactie (2)
- (8). Sistem de spalare
- (9). Recipienti deseuri biologice
- (10). Sistem de protectie fluorofori avand ferestre mobile
- (11). Sistem optic simplu de evaluare
 - De exemplu de tip fluorescent
 - Format din camera, filtre, lentile, leduri
- (12). Sistem de analiza si control
 - Controleaza elementele optice, electronice si mecanice
 - Realizeaza corectiile de erori
 - Comunica direct sau prin intermediul unui dispozitiv mobil (telefon sau tableta) cu unitatea de integrare si analiza statistica a datelor

Procedeul de obtinere a elementul critic structura partial nedeformabila (1) este de acoperire a acestuia si fixarea a elementelor de detectie imagistica, cum ar fi dar nelimitativ, fluorofori dintr-o pereche FRET (F1), si fixarea ulterior in matrice a elementelor de detectie (D), cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi sau secvente de material genetic. Pentru fixarea elementelor (F1 si D) la suprafata se pot utiliza reactii chimice directe intre acestia si suprafata sau utilizarea unor elemente polimerizabile intermediare (eventual cu folosirea de elemente de ghidare si control a polimerizarii de tip radiatie luminoasa, incalzire, camp electric).

Procedeul de analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii consta in:

- preluarea probei (P) de catre sistemul de recoltare proba (6),

- amestecarea acesteia echivolumic cu solutia/suspensia de calibrare (SC) in sistemul de amestecare (7) si de injectare in spatiul de reactie (2)
- cuantificarea temperaturii sau incalzirea la o temperatura cunoscuta
- mentinerea in spatiul de reactie (2) un timp standardizat
- utilizarea sistem de aplicare presiune (4) pentru alipirea suprafetei deformabile (3) la structura partial nedeformabila (1) pentru a obtine contactul intre fluorofori (F1 si F2)
- expunerea la radiatie produsa de leduri si obtinerea imaginilor de fluorescenta
- identificarea si cuantificarea zonelor de fluorescenta FRET (sau dupa caz de modificare a fluorescentei)
- digitalizarea informatiei (de exemplu 0 - lipsa legarii, 1 – fluorescenta specifica pentru T, 2 – Fluorescenta specifica pentru C) si aplicarea mecanismelor de corectie de erori
- trimiterea informatiei pentru analiza statistica la nivel centralizat pentru validare si luare de decizii

Particularitatea inventiei consta in utilizarea unei codificari spatiale a legaturilor de complementaritate, cum ar fi dar nelimitativ, antigen-anticorp sau secvente complementare de material genetic (ADN sau ARN). Tipurile distincte de analize necesita compartimente distincte (pentru ADN, anticorpi sau antigene) datorita prelucrarilor preliminare diferite si pentru evitarea erorilor experimentale (de interactie intre antigenele si anticorpii din proba). Codificarea este imprimata spatial la nivelul unei incinte deformabile, cum ar fi dar nelimitativ, de tip multistrat (sandvis) ce contine o membrana deformabila sau o solutie vascoelastica, a carei comprimare pe suprafata pe care este fixat elemental complementar celui testat se realizeaza o amprenta de dimensiuni superioare elementului testat. Aceasta amplificare a amprentei pe suprafata deformabila este codificata digital, cum ar fi dar nelimitativ, folosind fluorescent de tip FRET. Aplicatiile medicale includ detectia antigenelor sau anticorpilor specifici, de tipul celor asociati unor patologii infectioase, antigenelor de suprafata sau solubile

specifice conditiilor fiziologice sau patologice. Aplicatiile medicale includ identificari de material genetic pentru cuantificarea riscului de rezistenta la antibiotic. Aplicatiile industriale includ identificarea persoanei pe baza amprentei biologice (inclusiv ADN), detectia riscului de accidentare (folosind de exemplu detectia hormonilor de stres), detectia sigurantei alimentare prin detectia de contaminanti (pentru care sunt cunoscute elemente de complementaritate de tip anticorp), identificarea originii produselor biologice (pe baza caracterizarii ADN) inclusiv pentru combaterea contrabandei cu produse recoltate din natura (animale sau plante) in vederea protectiei ecologice sau fiscal-contabile.

Utilizarea sistemelor de detectie clasica de tip array, care detecteaza un numar ridicat de teste intr-o singura proba necesita o analiza a intensitatii semnalului (de obicei fluorescent) si il digitalizeaza in vederea compararii cu un prag sau cu o grila de masurare. In acest sens este nevoie de :

- Un sistem imagistic care sa aiba o sensibilitate ridicata si cu un zgomot termic redus
- Aceste sisteme sunt disponibile comercial, dar au asociate costuri ridicate.
- Un control precis al conditiilor locale

Pentru a combate scaderea preciziei de masuratoare in functie de elemente locale (cum ar fi temperatura si timpul de reactie), unele sisteme traditionale folosesc o legare competitiva.

Ambele limitari ale sistemelor de tip array au ca efect secundar utilizarea unor sisteme complexe de analiza imagistica, cu o constructie voluminoasa si costuri ridicate. In contextul analizelor moderne, ce necesita complexitate in acelasi timp cu o flexibilitate ridicata a tehnologiei, este nevoie de o utilizare portabila, usoara, de catre un utilizator mediu specializat in tehnica de analiza, si la costuri minime.

Prezenta inventie solutioneaza aceasta problema prin :

- Utilizarea unei suprafețe flexibile și ușor deformabile ce realizează o amprentă amplificată dimensional față de moleculele sau structurile peste care este comprimată, permite diferențierea dimensională a amprentei între moleculele țintă (T) și cele competiționale (C) cu acestea (dar de dimensiuni diferite) față de situsurile de fixare de pe suprafața nedeformabilă (mai rigidă) dintr-un dispozitiv stratificat. Prin utilizarea de concentrații cunoscute ale mărtoșului competitor (C), și a unor condiții experimentale cunoscute (cum ar fi temperatura), se poate cuantifica raportul dintre concentrația elementului testat față de cea a competitorului ($[T]/[C]$) pe baza amprentei în suprafețele deformabile.
- Se pot utiliza la nivelul suprafeței relativ rigide (Detector – D) și la nivelul elementului de testat (T) și cel competițional (C) introdus în soluție/suspensie elemente ce pot realiza legături de complementaritate (D-T și D-C). D, T și C pot fi de natură diversă, cum ar fi antigene, anticorpi, secvențe de material genetic (dar se pot utiliza și alte variante ce pot interacționa într-o manieră predictibilă).
- Utilizarea amprentei deformabile permite analiza diametrului pentru molecule, și consecutiv utilizarea de sisteme imagistice de fluorescență necesită identificarea doar a diametrului amprentei, a limitei dintre amprentă și zona inconjuroare. Se poate utiliza în acest sens fluorescență de tip FRET ce identifică schimbarea spectrelor de fluorescență în zonele neafectate de deformare datorită distanței mici între perechile de fluorofori dispuse relativ uniform pe suprafața deformabilă și cea relativ rigidă. În acest caz diametrul amprentei se identifică în zona de lipsă a fluorescenței FRET. În situația utilizării stingerii fluorescenței secundară distanței dintre suprafața deformabilă și cea relativ rigidă, diametrul amprentei se cuantifică în interiorul zonei fluorescente.
- Utilizarea amprentelor suprafețelor deformabile relativ circulare permite utilizarea unor camere de fluorescență fără a fi necesară utilizarea unor zgomote termice mici, nefiind

semnificativ zgomotul termic din interiorul zonei nedeformate sau in cea deformata ci doar limita relativa intre acestea.

- Utilizarea de elemente competitionale (C) de dimensiuni suficient de diferite fata de cele de testat (T) permite realizarea de intervale distincte intre diametrele celor doua, cu o digitalizare directa a informatiei si o scadere a erorilor de digitalizare.
- Utilizarea de elemente competitionale (C) de dimensiuni suficient de apropiate fata de cele de testat (T), sau intr-un raport cunoscut, permite scaderea erorilor induse de agitatie termica si identificarea elementelor de corectie in functie de temperatura a raportului intre concentratia elementului de testat fata de cel competitional ($[T]/[C]$).
- Pentru o accelerare a legarii complementare se poate utiliza si o incalzire la o temperatura cunoscuta superioara celei a mediului inconjurator, ce poate simplifica si utilizarea corectiei in functie de temperatura.
- Legarea pe baza de amprenta presupune existenta unei singure molecule fixate (T sau C) la nivelul unei amprente, sau identificarea si corectarea erorilor date de legarea de doua sau mai multe molecule. Elementele de corectie utilizate sunt :
 - o Definirea unor elemente de predictibilitate de dispozitie spatiala a detectorului (D) de tip array permite identificarea legarilor nespecifice (in afara zonelor tinta).
 - o Identificarea raporturilor de concentratie intre tina si elementele competitionale ($[T]/[C]$) este dependenta de existenta unui numar de detectori (D) dar nu necesita un numar foarte mare de detectori. In acest sens se pot utiliza zone de depunere a detectorului (D) ce au risc minim de a prezenta doi detectori (D) chiar daca avem zone fara nici un detector (D)
 - o Identificarea legarii de doua elemente (T si/sau C) datorita existentei a doi detectori (D) in zona tinta se realizeaza prin evidentierea existentei unei forme

alungite a amprentei, cu impunerea unui prag experimental între raportul diametrului maxim și cel minim al amprentei pentru validarea digitală.

- Identificarea legării de mai multe elemente (T și/sau C) datorită existenței a mai mulți detectori (D) în zona tinta se realizează prin evidențierea existenței de amprente cu dimensiune în afara limitelor de digitalizare. În mod similar se poate invalida legările nespecifice.
 - Limitele amprentelor depind de factori locali, dar care induc erori sistematice. Astfel se pot identifica statistic limitele de digitalizare (pentru T și C) în proba concretă.
- Pentru detectia de multiple tinte se utilizează metode de zonare ce conțin detectori (D) diferiți (D1, D2, D3 ...) ce utilizează elemente de digitalizare și de corecție specifice pentru fiecare dintre acestea și delimitate prin elemente de identificare (I) ce pot fi cuantificate redundanți, de tipul dispunerii de zone noncodante (arii fără D), dispunerii de coduri secvențiale (I1, I2, I3 ...) pentru identificarea și corectarea de erori a zonelor de identificare (I) sau care nu pot fi citite. Identificarea zonării (I) se poate codifica pe canale distincte (de exemplu fluorofori diferiți) față de cele asociate detectiei, folosind alte lungimi de undă, sau model de fluorescență (de exemplu liniar în loc de circular). Nu cunoaștem existența unei soluții similare realizată sau brevetată până la ora actuală.

f) Prezentarea avantajelor rezultate din aplicarea invenției în raport cu stadiul tehnicii

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Prin evaluarea amprentei elementelor de cuantificat în funcție de amprenta pe care o lasă pe suprafața deformabilă, corelat cu utilizarea unor elemente de cuantificat distanțate (de tip FRET) față de suprafața relativ rigidă, se realizează o cuantificare

facila a unei amprente mult mai mari comparativ cu elementele cuantificate, ceea ce simplifica elementele optice utilizate in evluarea individuala a fiecarei amprente, cu digitalizarea informatiei si corectarea de erori induse de factori de mediu.

- Prin utilizarea unor consumabile de natura celor prezentate folosind metodologia asociata se pot utiliza dispozitive medicale ce utilizeaza elemente optice, mecanice si electronice simple, avand :
 - o Costuri reduce
 - o Dimensiuni reduce (apropiate de ale unui telefon mobil)
 - o Accesibilitate ridicata pentru aplicatii medicale, industriale si stiintifice
 - o Portabilitate.

- Utilizarea unei analize de tip statistic online permite identificarea in timp real a situatiei medicale si epidemiologice, cu o cresterea a accesibilitatii la servicii medicale in contextul unui impact economic negativ minim. Asociat cu un cost redus, se obtine astfel :
 - o Eficientizarea distantarii sociale moderate prin utilizarea diagnosticarii prin detectie de tip screening in masa repetat periodic, in vederea functionarii economiei si in caz de pandemie
 - o Raspuns centralizat la amenintari pentru care nu se cunosc elemente statistice particulare (cu obtinerea lor in timp real)
 - o Evaluari de tip screening ce pot reduce impactul economic al tratarii intregii populatii
 - o Identificarea riscurilor de aparitie a rezistentei la antibiotic, cu evidentierea solutiilor alternative la nivel local
 - o Identificarea riscurilor personale de imbolnavire in vederea preventiei si utilizarii acestora de catre firmele de asigurari de sanatate sau de catre organisme

guvernamentale, in vedere alocarii de resurse, convingerii schimbarii stilului de viata, utilizarii de metode compensatorii (de tip taxare suplimentara), in vederea scaderii costurilor generale asociate asigurarii accesului la sanatate

- Utilizarea dispozitivelor de catre personal mediu instruit in utilizarea acestora
- Identificarea si prevenirea fraudelor economice privind exploatarea si comercializarea produselor biologice (alimentare si non-alimentare)
- Identificarea si prevenirea comercializarii produselor biologice (alimentare si non-alimentare) din arii protejate
- Prevenirea riscurilor de accidente (prin identificarea factorilor asociati, cum ar fi hormonii de stress)
- Identificarea centralizata a riscurilor infractionale prin detectia profilului biologic (cum ar fi de exemplu la accesul in infrastructuri critice)

g) Prezentarea, pe scurt, a figurilor din desene

Figura1 prezinta schema constructiva a elementelor active in detectia si cuantificarea elementelor de testat : (1) Structura partial nedeformabila transparenta ; (2) Spatiul de reactie subtire de tip microfluidic ; (3) Suprafata deformabila ; (4) Sistem de aplicare presiune asupra suprafetei deformabile ; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET ; (F2) Fluorofor 2 din perechea FRET ; (D) Elemente de detectie (de exemplu anticorpi).

Figura2 prezinta schema functionala de descriere a mecanismului de functionare, respectiv legarea competitiva : (1) Structura partial nedeformabila transparenta ; (2) Spatiul de reactie subtire de tip microfluidic ; (3) Suprafata deformabila ; (4) Sistem de aplicare presiune asupra suprafetei deformabile ; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET ; (F2) Fluorofor 2 din perechea FRET ; (D) Elemente de detectie (de exemplu anticorpi) ; (T) Molecula tinta ; (C) Molecula competitiva. Legarea competitiva a moleculei tinta (T) sau a celei

competitionale (C) la elementele de detectie (D) se realizeaza aleator, in functie de agitata termica si de concentratiile acestora ([T] si [C]).

Figura3 prezinta schema functionala de descriere a mecanismului de functionare, respectiv deformarea suprafetei (membranei) sub actiunea sistemului de aplicare a presiunii :

(1) Structura partial nedeformabila transparenta ; (2) Spatiul de reactie subtire de tip microfluidic ; (3) Suprafata deformabila ; (4) Sistem de aplicare presiune asupra suprafetei deformabile ; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET ; (F2) Fluorofor 2 din perechea FRET ; (D) Elemente de detectie (de exemplu anticorpi) ; (T) Molecula tinta ; (C) Molecula competitionala.

(Amprenta T) Amprenta la suprafata structurii nedeformabile realizata de suprafata deformabila in jurul moleculei tinta (T), care indeplinsete conditia ca distanta dintre cele doua suprafete sa fie mai mare decat cea necesara aparitiei fluorescentei FRET (intre F1 si F2). (Amprenta C) Amprenta la suprafata structurii nedeformabile realizata de suprafata deformabila in jurul moleculei competitionale (C), care indeplinsete conditia ca distanta dintre cele doua suprafete sa fie mai mare decat cea necesara aparitiei fluorescentei FRET. Se observa scaderea distantei dintre F1 si F2 cu obtinerea fluorescentie FRET, in afara amprentelor T si C. Se observa dimensiunile diferite ale amprentelor T si C, corelate cu dimensiunile T si C.

Figura4 prezinta schema de ansamblu : (P) Sistem de recoltare proba ; (SC) Recipient ce contine solutia/suspensia de calibrare ; (A) Sistem de amestecare ; (ID) Sistem de identificare (descrie in Fig.1-3) ; (S) Sistem de spalare ; (DB) Recipient deseuri biologice ; (SO) Sistemul optic de evaluare.

h) Prezentarea unuia sau mai multor exemple de realizare/aplicare a inventiei cu referire la figurile explicative

Se da in continuare un exemplu de realizare a inventiei, în legatura si cu figurile 1... 4, care prezinta :

- Amestecarea in sistemul de amestec (A) folosind volume egale (sau in raport cunoscut) intre proba de testat de la sistemul de recoltare proba (P) si solutia de calibrare din recipientul ce contine solutia/suspensia de calibrare (SC) ;
- Injectarea in sistemul de identificare (ID) unde se astepta o perioada calibrata de timp, se masoara si/sau se stabileste o temperatura peste cea a mediului inconjurator, pentru legarea prin complementaritate de elementele de detectie (D) (de exemplu anticorpi), molecula tinta (T) si/sau molecula competitionala (C) ; Aceasta din urma (C) se afla depozitata in concentratie cunoscuta in recipientul solutiei de calibrare (SC)
- Aplicarea unei presiuni de catre sistemul de aplicare presiunie (4) asupra suprafetei deformabile (3) ce se apropie de structura partial nedeformabila (1) cu eliminarea elementelor ramase nefixate dupa reactie si spalare cu sistemul de spalare (S)
- Evaluarea deformarii suprafetei deformabile (3) prin intermediul amprentei acestora (Amprenta T si Amprenta C) prin lipsa de fluorescenta FRET asociata apropierii fluoroforilor (F1 si F2) in celelalte zone decat cele ale amprentelor
- Cuantificarea diametrului amprentelor si digitalizarea semnalului (0-nelegare, 1-legare T, 2-Legare C) in functie de grilele specifice perechii T-C concrete, si aplicarea altor algoritmilor de corectie de erori

Bibliografie

1. Lequin RM, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Clin Chem. 2005 Dec;51(12):2415-8.
2. Hung JH, Weng Z, Analysis of Microarray and RNA-seq Expression Profiling Data, Cold Spring Harb Protoc. 2017 Mar 1;2017(3).
3. Ramos-Vara JA, Technical aspects of immunohistochemistry, Vet Pathol. 2005 Jul;42(4):405-26.

4. Tao J, Zhang J, Liu X, Jin H, Jiang C, Yin Y, Establishment of indirect immunofluorescence assay for rotavirus, *Acta Virol.* 2016 Mar;60(1):78-84.
5. McLeod A, Economics of avian influenza management and control in a world with competing agendas, *Avian Dis.* 2010 Mar;54(1 Suppl):374-9.
6. Uscher-Pines L, Schwartz HL, Ahmed F, Zheteyeva Y, Meza E, Baker G, Uzicanin A, School practices to promote social distancing in K-12 schools: review of influenza pandemic policies and practices, *BMC Public Health.* 2018 Mar 27;18(1):406.
7. Wang C, Liu Z, Chen Z, Huang X, Xu M, He T, Zhang Z, The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis, *J Med Virol.* 2020 Mar 13.
8. Cunha CB, Opal SM, Antibiotic Stewardship: Strategies to Minimize Antibiotic Resistance While Maximizing Antibiotic Effectiveness, *Med Clin North Am.* 2018 Sep;102(5):831-843.
9. Waseem H, Jameel S, Ali J, Saleem Ur Rehman H, Tauseef I, Farooq U, Jamal A, Ali MI, Contributions and Challenges of High Throughput qPCR for Determining Antimicrobial Resistance in the Environment: A Critical Review, *Molecules.* 2019 Jan 3;24(1)

REVENDICARI

1. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii **caracterizat prin aceea ca** este realizata o *amplificare a semnalului fluorescent* prin utilizarea fluorescenței amprentei obtinute pe o suprafata deformabila prin compresia elementului fixat de detecor pe o suprafata relativ rigida (respectiv a unui numar crescut de fluorofori ce pot fi asociati suprafetei amprenteii cu cateva ordine de marime mai mare decat pentru un singur fluorofor), in locul unui singur fluorofor asociat elementului de testat si detectarea amprenteii cu precizie folosind metode fluorescente (de tip FRET sau de stingere a fluorescenței) ce pot masura distante de ordinul nanometrilor dintre amprenta (de pe suprafata deformabila) si o suprafata relativ rigida (pe care este comprimata suprafata deformabila).
2. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarea 1 **caracterizat prin aceea ca** este alcatuit dintr-o structura multistrat ce contine (fig.1): **(1)** o structura partial nedeformabila transparenta; **(2)** un spatiul de reactie subtire de tip microfluidic; **(3)** o suprafata deformabila; **(4)** un sistem de aplicare presiune asupra suprafetei deformabile; **(F1)** un element component al detectiei proximitatii, cum ar fi dar nelimitativ, fluoroforul 1 din perechea FRET, atasat la suprafata partial nedeformabila dinspre spatial de reactie; **(F2)** un element component al detectiei proximitatii, cum ar fi dar nelimitativ, fluoroforul 2 din perechea FRET, atasat la suprafata deformabila dinspre spatial de reactie; **(D)** elemente de detectie, cum ar fi dar nelimitativ, anticorpi, atasati la suprafata partial nedeformabila dinspre spatial de reactie.
3. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1 si 2 **caracterizat prin aceea ca** realizeaza **a)** legarea competitiva (fig.2) la nivelul elementelor de detectie (D) de (T) elemente tinta, cum ar fi

dar nelimitativ, molecule tinta, sau de (C) elemente competitionale, cum ar fi dar nelimitativ, molecule competitionale in concentratie cunoscuta, ce au dimensiuni diferite (T fata de C); **b)** iar la aplicarea de presiune (fig.3) cu ajutorul sistemului de aplicare presiune (4); **c)** se realizeaza o apropiere a suprafetei deformabile (3) de structura partial nedeformabila transparenta (1); **d)** cu deformarea in dreptul structurilor fixate de detectorii (D) cu realizarea de amprente diferite dimensional (Amprenta T si Amprenta C) pentru elementele tinta (T) si cele competitionale (C); **e)** care sunt identificate prin cuantificarea amprentei folosind elementele de detectie a proximitatii (F1 si F2), si a numarului acestora pentru elementele tinta (T) si cele competitionale (C).

4. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2 si 3 **caracterizat prin aceea ca** realizeaza **a)** o digitalizare a semnalului de legare in functie de legarea elementului tinta (T) sau a celui competitional (C) sau a lipsei de legare prin incadrarea amprentei in limite distincte caracteristice fiecarei perechi de elemente tinta-elemente competitionale; **b)** cu realizarea unei corectii de erori in functie de elemente geometrice ale amprentei, cum ar fi dar nelimitativ, diametrele acestora, existent de forme particulare de tip elipsa ce evidentiaza existent pe aceeasi amprenta de detector (D) multiplii, utilizarea de matrici predictibile de dispunere a detectorilor (D) pentru evidentierea legarilor nespecifice; **c)** realizarea de statistici dimensionale la nivelul fiecarei conditii experimentale (fiecarui test multiplu) pentru ingustare limitelor dimensionale de digitalizare; **d)** precum si prin utilizare de metode fizice de corectie, prin utilizarea de temperaturi cunoscute (aplicate prin incalzire/racire) si/sau utilizarea de corectii in functie de aceste elemente.
5. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3 si 4 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza suprafete deformabile (3) ce poate fi reprezentata **a)** dintr-o folie foarte subtire deformabila; **b)** sau

elemente vascoelastice deformabile sau asigurand o tensiune superficiala care sa permita realizarea amprentelor (Amprenta T si C), cum ar fi dar nelimitativ, geluri, structuri composite; **c)** elemente stratificate inclusiv cu o limitare a stratificarii de tipul membranelor lipidice artificiale; **d)** structuri ce pot sa isi schimbe forma in camp electric sau magnetic prin interactii in interiorul acestora sau cu mediul.

6. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3, 4 si 5 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza suprafete deformabile (3) ce poate fi reprezentata **a)** dintr-o suprafata continua, cum ar fi dar nelimitativ, o folie foarte subtire deformabila; **b)** o suprafata discontinua, cum ar fi dar nelimitativ, o structura reticulate; **c)** din suprafete distincte, cum ar fi dar nelimitativ, de tip liposomal; **d)** cu sau fara integrarea sistemului de aplicare presiune integrat in interior, cum ar fi dar nelimitativ, particule feromagnetice; **e)** cu sau fara utilizarea de elemente de detectie pe suprafata.
7. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3, 4, 5 si 6 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza suprafete deformabile (3) si in locul suprafetelor partial nedeformabile.
8. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3, 4, 5, 6 si 7 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza(fig.4) **a)** un sistem de recoltare si prelucrare proba (P), cum ar fi dar nelimitativ, pentru extractia materialului genetic; si **b)** o solutie sau suspensie de calibrare pastrat in recipientul specific (SC); acestea doua impreuna sunt **c)** amestecate in sistemul de amestec (A); **d)** injectate in sistemul de identificare (ID) (conform revendicarilor 1,2,3 si 4); **e)** mentinut in conditii standard sau cunatificate de temperatura si timp; **f)** cu indepartarea elementelor nefixate folosind sistemul de spalare (S); **g)** cu indepartarea elementelor nefixate in recipientul

pentru deseuri biologice (DB); **h**) si evaluarea optica si computationala descrisa la revendicarile 1,2,3 si 4.

9. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 si 8 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza compartimente de identificare (ID) distincte (fig.4) pentru utilizare de elemente complementare diferite in vederea scaderii erorilor, cum ar fi dar nelimitativ pentru detectia de antigene (folosind ca detector anticorpi specifici), anticorpi (folosind ca detector antigene specifice) sau secvente de material genetic (folosind ca detector secvente genetice complementare), avand sisteme de prelucrare proba (P) distincte, cum ar fi dar nelimitativ de extractie a materialului genetic.
10. Procedeu si dispozitiv pentru analiza in vitro digitala codificata spatial a complementaritatii, conform cu revendicarile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 si 9 **caracterizat prin aceea ca** utilizeaza elemente de evaluare a fluorescentei simplificate avand dimensiuni si costuri foarte reduse comparativ cu elementele utilizate pana in acest moment, inclusiv cu detectia folosind dispozitive portabile si utilizate de persoane cu instruire medie si evaluare centralizata de tip inteligenta artificiala, punand la dispozitia cadrelor medicale si a sistemelor de sanatate o situatie la zi in funcite de istoricul personal si evolutia epidemiologica.

DESENE EXPLICATIVE

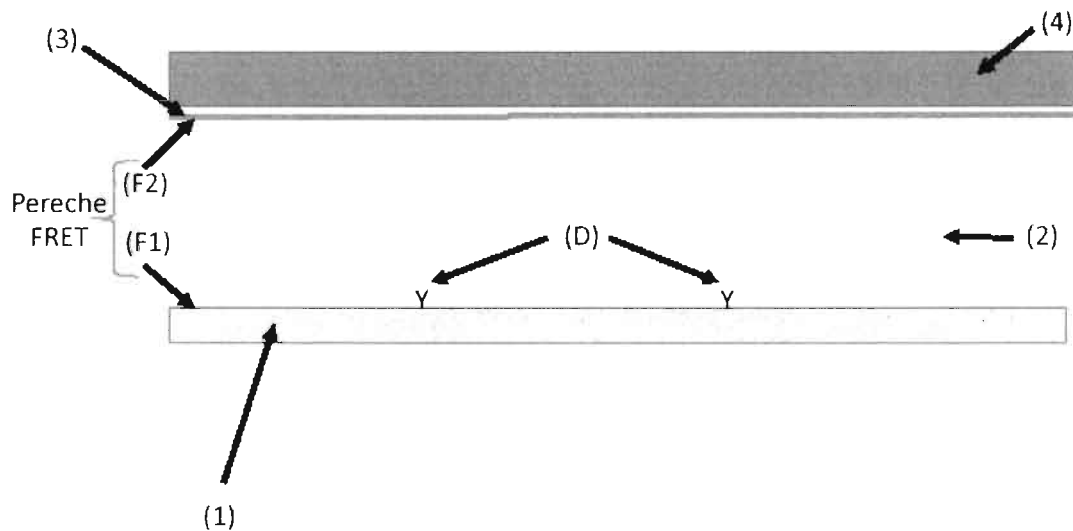


Figura 1. Schema constructiva a elementelor active in detectia si cuantificarea elementelor de testat

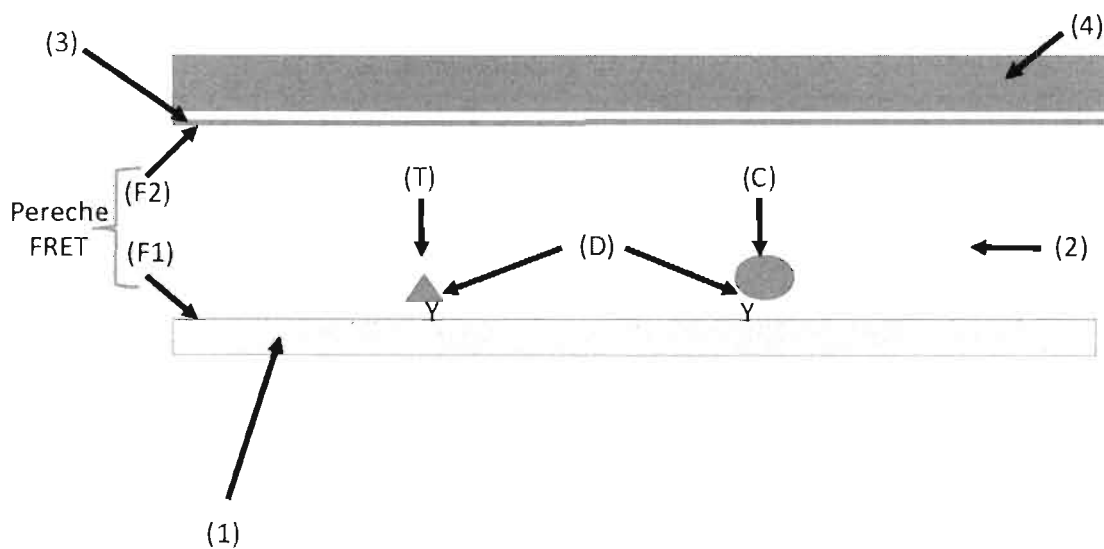


Figura 2. Schema functionala de descriere a mecanismului de functionare. Legarea competitiva.

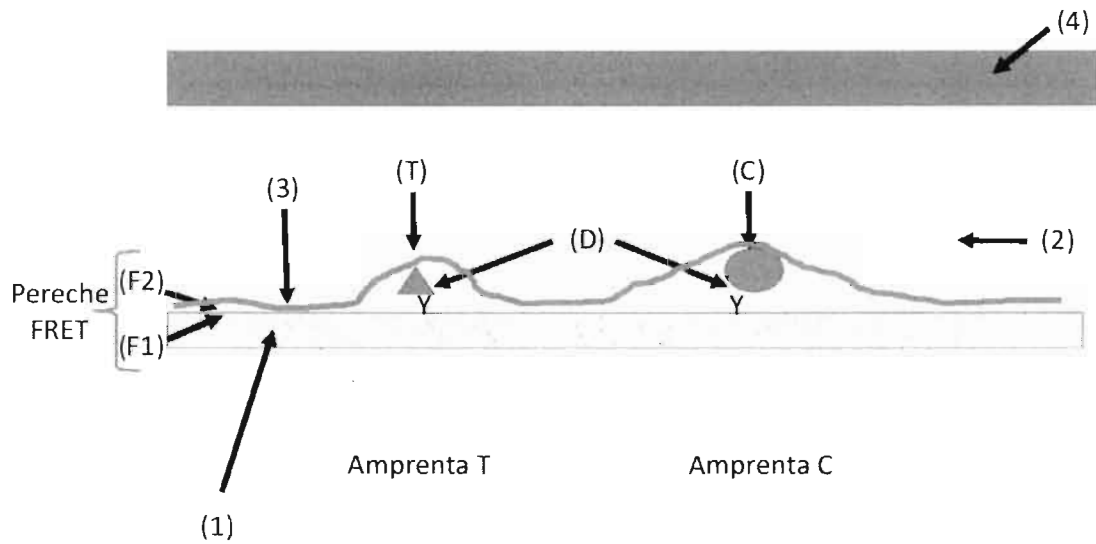


Figura 3. Schema funcțională de descriere a mecanismului de funcționare. Deformarea suprafeței (membranei) sub acțiunea sistemului de aplicare a presiunii.

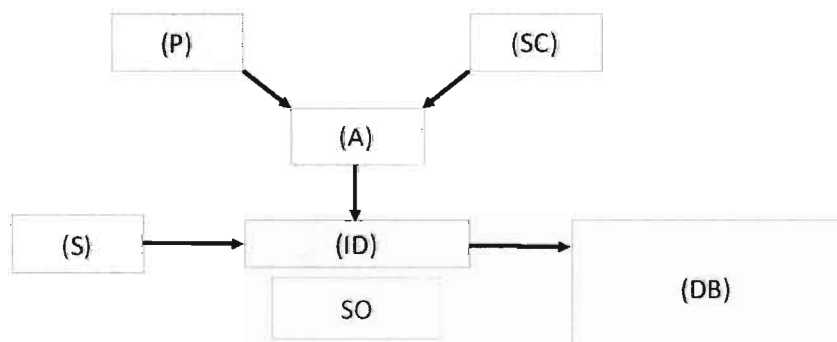


Figura 4. Schema de ansamblu