



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/01/2024** BOPI nr. **1/2024**

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

(73) Titular:
• **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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2018/152005 A1; EP 1761641 B1

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



1 Invenția se referă la o metodă și la un dispozitiv pentru analiza *in vitro* digitală codi-
2 ficată spațial a complementarității, destinat detecției și cuantificării complementarității, cum
3 ar fi dar nelimitativ, detecția și cuantificarea antigenelor, anticorpilor sau a secvențelor de
4 material genetic. Aplicațiile științifice includ reacții de cuantificare a anticorpilor, antigenelor,
5 secvențe de material genetic, interacții între proteine și interacții între proteine și diverse
6 structuri (cum ar fi material genetic sau structuri lipidice).

7 Este cunoscut că testele de complementaritate pot detecta antigene, anticorpi sau
8 secvențe de material genetic printr-o varietate mare de metodologii, pornind de la testul
9 ELISA [1] până la analize microarray [2, 3]. Principiile de evaluare a reacției de comple-
10 mentaritate se bazează de obicei pe metode imagistice directe sau fluorescente [4]. Necesi-
11 tatea diagnostică este importantă în epoca noastră, dar în plină schimbare datorită presiuni-
12 lor sociale, economice [5] și de distanțare socială [6] secundară riscurilor infecțioase. Supli-
13 mentar, este necesară existența unor metode economice și flexibile de adaptare la noile
14 necesități de testare *in vitro* datorită mutațiilor și selecțiilor genetice [7]. Acestea permit
15 apariția de noi patogeni ce trebuie testați fiabil, flexibil și accesibil pentru populație. În plus,
16 presiunea rezistenței la antibiotice dezvoltă o presiune etică în administrarea antibioticelor
17 cu realizarea dezideratului de administrare a antibioticului cel mai puțin agresiv față de
18 microorganism dar încă eficient (pentru evitarea apariției și transmiterii rezistenței multiple
19 la antibiotice), în contrast cu dezideratul de tratare eficientă a pacienților [8]. Această testare
20 a rezistenței la antibiotice se poate realiza prin metode qPCR, datorită existenței de informații
21 privind genele de rezistență la antibiotic [9]. Principalul dezavantaj al metodelor fluorescente
22 este reprezentat de necesitatea de a măsura fluorescența cu o precizie ridicată, datorită
23 intensității reduse a semnalului fluorescent. Dezavantajele metodelor prezentate pentru teste
24 multiple sunt reprezentate de complexitatea dispozitivelor de testare, dimensiunile mari ce
25 fac imposibilă mutarea acestora, și costurile asociate, cu limitare în funcție de costuri sau de
26 existența a echipamentelor a accesibilității în scop medical, industrial sau științific. Secundar
27 accesibilității reduse, în caz de pandemie se pot mobiliza dificil resurse diagnostice supli-
28 mentare necesare asocierii funcționării economiei cu o detecție de tip screening în masă
29 repetat periodic în vederea eficientizării distanțării sociale moderate. Un alt dezavantaj al
30 metodelor prezentate este un grad redus de detectare și corecție de erori.

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

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

37 Problema pe care o rezolvă invenția este reprezentată de amplificarea semnalului
38 fluorescent prin creșterea suprafeței de detecție pentru un singur complex de detecție (cum
39 ar fi antigen-anticorp), și consecutiv a numărului de perechi de fluorofori FRET (cu câteva
40 ordine de mărime) comparativ cu metodele uzuale, prin utilizarea amprentei pe care o lasă
41 perechea de detecție (cum ar fi antigen-anticorp), pe o suprafață deformabilă. Detecția cu
42 precizie a acestei amprente se realizează prin metode de fluorescență (FRET sau de sting-
43 gere a fluorescenței) datorită capacității FRET de a măsura distanțe de ordinul nanometrilor
44 (la care se obține o astfel de fluorescență). Prin utilizarea amprentei pe o suprafață defor-
45 mabilă, se pot măsura fluorescent un număr ridicat de fluorofori asociați acesteia (sau a
46 spațiului din jurul amprentei), în loc de măsurare a fluorescenței unei singure perechi de
47 fluorofori. De exemplu, dacă amprenta unui antigen este mai mare în diametru cu
5 micrometri comparativ cu dimensiunile antigenului, și densitatea de fluorofori este de

RO 134652 B1

500 fluorofori pe micron pătrat, avem o suprafață (πr^2) de 19,6 micrometri² ce conține 9800 de fluorofori. În acest caz, avem o amplificare a semnalului de aproape 4 ordine de mărime a semnalului (9800 față de 1). În acest caz, este suficientă utilizarea unui sistem optic (camera optică, sistem de lentile și filtre) cu o eficiență cuantică mai bună de 0,1%, și datorită posibilității de a utiliza timpi de expunere mari (de ordinul secundelor) se poate folosi o cameră foto a unui telefon mobil (ce costă până în 500 de euro) comparativ cu sistemele optice necesare detecției de matrici de fluorescență (ce au costuri de aproape 1000 de ori mai mari). Utilizarea de elemente de calibrare (de exemplu microsferă ce au pe suprafață antigene asemănătoare celor de testat) poate duce la o creștere a suprafeței amprente (similar cu cea pentru antigene) cu o detecție facilă a diferenței dintre antigene și controlul de concentrație cunoscută, cu calcularea facilă a concentrației antigenului de măsurat. În acest fel se poate crește precizia de măsurat simultan cu scăderea costului de analiză într-o manieră ce permite (din punct de vedere al costurilor și preciziei) analiza de tip detecție repetată în masa de multiple elemente patologice (cum ar fi infecții) și fiziologice (cum ar fi perioadele fertile) cu scăderea costului general al asigurării stării de sănătate a populației. Acest screening în masă repetat periodic se poate realiza inclusiv portabil (sau în cabinetul fiecărui medic de familie), datorită scăderii complexității și secundar a dimensiunii dispozitivelor de citire, cu o creștere suplimentară a accesibilității. Dimensiunile și costurile foarte reduse, pot face acest dispozitiv utilizabil și cu o pregătire medie, dacă analiza datelor se realizează centralizat, de tip inteligența artificială, punând la dispoziția cadrelor medicale și a sistemelor de sănătate o situație la zi în funcție de istoricul personal și evoluția epidemiologică.

Problema pe care o rezolvă invenția este de realizare a unui dispozitiv de detecție și cuantificare digitală pentru elemente de complementaritate, cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi, secvențe genetice, având multiple sisteme de corecții de erori, într-o manieră simplificată constructiv, care să permită o flexibilitate ridicată în utilizare, precum și costuri asociate mici pentru o accesibilitate ridicată (produs și metodă). De exemplu, într-un spațiu delimitat al senzorului se detectează antigene, pentru identificarea și cuantificarea patogenilor sau a semnalizatorilor solubili (cum ar fi hormonii); în alt spațiu delimitat al senzorului se detectează anticorpii, pentru identificarea și cuantificarea imunității (cum ar fi după expunere sau după vaccinare); și în alt spațiu delimitat se detectează secvențe de material genetic pentru cuantificarea infecțiilor virale, rezistenței la antibiotice (asociată cu secvențe cunoscute) sau a diferitelor gene asociate persoanei (pentru evaluarea riscului genetic sau identificarea cu precizie a persoanei pentru evitarea erorilor terapeutice). Această compartimentalizare (utilizarea de compartimente distincte în funcție de tipurile de elemente detectate cum ar fi antigene, anticorpi sau secvențe de material genetic, pentru evitarea reacțiilor perturbatoare) este necesară pentru a evita reacțiile încrucișate (între antigenele și anticorpii din ser de exemplu) sau pentru necesitatea de tratament preliminar distinct (de extragere a materialului genetic).

Dipozitivul conform invenției este reprezentat de o structură de tip stratificat (sandviș) constând din:

(1). Structura parțial nedeformabilă transparentă pe suprafața căreia sunt dispuse:
- relativ uniform (fără măsuri speciale de asigurare a uniformității) elemente de detecție imagistică, cum ar fi dar nelimitativ, fluorofori dintr-o pereche FRET (F1) independent de ordinea fluoroforilor;

- într-o matrice elementele de detecție (D), cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi, secvențe de material genetic.

(2). Spațiul de reacție subțire de tip microfluidic.

RO 134652 B1

- 1 (3). Suprafața deformabilă.
- ce poate fi o membrană subțire deformabilă, elemente vascoelastice, de asigurare
3 a unei tensiuni superficiale;
- având elemente de detecție imagistică, cum ar fi dar nelimitativ, fluorofori dintr-o
5 pereche FRET (F2);
- ce poate colaba spațiul de reacție (2) și ajunge în contact cu structura parțial
7 nedeformabilă (la aplicarea unor forțe externe);
- ce poate realiza fluorescența de tip FRET la contactul dintre fluorofori (F1 și F2);
9 - ce se poate deforma la colabarea spațiului de reacție (2) la prezența de elemente
fixate de detector (D);
11 - având o deformare dependentă de dimensiunea elementelor și a forțelor aplicate
asupra suprafeței deformabile.
- 13 (4). Sistem de aplicare presiune asupra suprafeței deformabile.
- ce poate fi de tip recipient cu presiune în gaz pentru uniformitatea presiunilor
15 exercitate asupra suprafeței deformabile (3).
- (5). Recipient ce conține soluția/suspensia de calibrare (SC) având o concentrație
17 cunoscută de competitor (C).
- (6). Sistem de recoltare proba (P) și prelucrare preliminară.
19 - de exemplu pentru fluidificarea probelor de puroi;
- de exemplu pentru extracția acizilor nucleici.
- 21 (7). Sistem de amestecare echivolumică (sau în raport volumetric cunoscut) a
soluției/suspensiei de calibrare (SC) și a probei (P) și de injectare în spațiul de reacție
23 (2).
- (8). Sistem de spălare.
- 25 (9). Recipienti deșeuri biologice.
- (10). Sistem de protecție fluorofori având ferestre mobile.
- 27 (11). Sistem optic simplu de evaluare.
- De exemplu de tip fluorescent
29 - Format din camera, filtre, lentile, leduri.
- (12). Sistem de analiză și control
31 - Controlează elementele optice, electronice și mecanice.
- Realizează corecțiile de erori.
33 - Comunică direct sau prin intermediul unui dispozitiv mobil (telefon sau
tabletă) cu unitatea de integrare și analiza statistică a datelor.
- 35 Metoda de obținere a elementului critic structura parțial nedeformabilă (1) este de
acoperire a acestuia și fixare a elementelor de detecție imagistică, cum ar fi dar nelimitativ,
37 fluorofori dintr-o pereche FRET (F1), și fixarea ulterior în matrice a elementelor de detecție
(D), cum ar fi dar nelimitativ, antigene, anticorpi sau secvențe de material genetic. Pentru
39 fixarea elementelor (F1 și D) la suprafață se pot utiliza reacții chimice directe între aceștia
și suprafața sau utilizarea unor elemente polimerizabile intermediare (eventual cu folosirea
41 de elemente de ghidare și control a polimerizării de tip radiație luminoasă, încălzire, câmp
electric).
- 43 Metoda de analiză *in vitro* digitală codificată spațial a complementarității constă în:
- preluarea probei (P) de către sistemul de recoltare proba (6);
45 - amestecarea acesteia echivolumic cu soluția/suspensia de calibrare (SC) în
sistemul de amestecare (7) și de injectare în spațiul de reacție (2);
47 - cuantificarea temperaturii sau încălzirea la o temperatură cunoscută;
- menținerea în spațiul de reacție (2) un timp standardizat;

RO 134652 B1

- utilizarea sistem de aplicare presiune (4) pentru alipirea suprafeței deformabile (3) la structura parțial nedeformabilă (1) pentru a obține contactul între fluorofori (F1 și F2);	1
- expunerea la radiație produsă de leduri și obținerea imaginilor de fluorescență identificarea și cuantificarea zonelor de fluorescență FRET (sau după caz de modificare a fluorescenței);	3 5
- digitalizarea informației (de exemplu 0 - lipsa legării, 1 - fluorescența specifică pentru T, 2 - Fluorescența specifică pentru C) și aplicarea mecanismelor de corecție de erori;	7
- trimiterea informației pentru analiza statistică la nivel centralizat pentru validare și luare de decizii.	9
Particularitatea invenției constă în utilizarea unei codificări spațiale a legăturilor de complementaritate, cum ar fi dar nelimitativ, antigen-anticorp sau secvențe complementare de material genetic (ADN sau ARN). Tipurile distincte de analize necesită compartimente distincte (pentru ADN, anticorpi sau antigene) datorită prelucrărilor preliminare diferite și pentru evitarea erorilor experimentale (de interacție între antigenele și anticorpii din probă). Codificarea este imprimată spațial la nivelul unei incinte deformabile, cum ar fi dar nelimitativ, de tip multistrat (sandviș) ce conține o membrană deformabilă sau o soluție vascoelastică, a cărei comprimare pe suprafața pe care este fixat elementul complementar celui testat se realizează o amprentă de dimensiuni superioare elementului testat. Această amplificare a amprentei pe suprafața deformabilă este codificată digital, cum ar fi dar nelimitativ, folosind fluorescență de tip FRET. Aplicațiile medicale includ detecția antigenelor sau anticorpilor specifici, de tipul celor asociați unor patologii infecțioase, antigenelor de suprafață sau solubile specifice condițiilor fiziologice sau patologice. Aplicațiile medicale includ identificări de material genetic pentru cuantificarea riscului de rezistență la antibiotic. Aplicațiile industriale includ identificarea persoanei pe baza amprentei biologice (inclusiv ADN), detecția riscului de accidentare (folosind de exemplu detecția hormonilor de stres), detecția siguranței alimentare prin detecția de contaminanți (pentru care sunt cunoscute elemente de complementaritate de tip anticorp), identificarea originii produselor biologice (pe baza caracterizării ADN) inclusiv pentru combaterea contrabandei cu produse recoltate din natură (animale sau plante) în vederea protecției ecologice sau fiscal-contabile.	11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
Utilizarea sistemelor de detecție clasică de tip array, care detectează un număr ridicat de teste într-o singură probă necesită o analiză a intensității semnalului (de obicei fluorescent) și îi digitalizează în vederea comparării cu un prag sau cu o grilă de măsurare. În acest sens este nevoie de:	31 33
- un sistem imagistic care să aibă o sensibilitate ridicată și cu un zgomot termic redus. Aceste sisteme sunt disponibile comercial, dar au asociate costuri ridicate;	35
- un control precis al condițiilor locale.	
Pentru a combate scăderea preciziei de măsurătoare în funcție de elemente locale (cum ar fi temperatura și timpul de reacție), unele sisteme tradiționale folosesc o legare competitivă.	37 39
Ambele limitări ale sistemelor de tip array au ca efect secundar utilizarea unor sisteme complexe de analiză imagistică, cu o construcție voluminoasă și costuri ridicate. În contextul analizelor moderne, ce necesită complexitate în același timp cu o flexibilitate ridicată a tehnologiei, este nevoie de o utilizare portabilă, ușoară, de către un utilizator mediu specializat în tehnica de analiză, și la costuri minime.	41 43
Prezenta invenție soluționează această problemă prin:	45
- 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 ținta (T) și cele com-	47

RO 134652 B1

- 1 petiționale (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 concen-
3 trații cunoscute ale matorului competitor (C), și a unor condiții experimentale cunoscute
(cum ar fi temperatura), se poate cuantifica raportul dintre concentrația elementului testat
5 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
7 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
9 antigene, anticorpi, secvențe de material genetic (dar se pot utiliza și alte variante ce pot
interacționa într-o manieră predictibilă);
 - 11 - utilizarea amprentei deformabile permite analiza diametrului pentru molecule, și
consecutiv utilizarea de sisteme imagistice de fluorescență necesită identificarea doar a
13 diametrului amprentei, a limitei dintre amprenta și zona înconjurătoare. Se poate utiliza în
acest sens fluorescența de tip FRET ce identifică schimbarea spectrelor de fluorescență în
15 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
17 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
19 cuantifică în interiorul zonei fluorescente;
 - utilizarea amprentelor suprafețelor deformabile relativ circulare permite utilizarea
21 unor camere de fluorescență fără a fi necesară utilizarea unor zgomote termice mici, nefiind
semnificativ zgomotul termic din interiorul zonei nedeformate sau în cea deformată ci doar
23 limita relativă între acestea;
 - utilizarea de elemente competiționale (C) de dimensiuni suficient de diferite față de
25 cele de testat (T) permite realizarea de intervale distincte între diametrele celor două, cu o
digitalizare directă a informației și o scădere a erorilor de digitalizare;
 - 27 - utilizarea de elemente competiționale (C) de dimensiuni suficient de apropiate față
de cele de testat (T), sau într-un raport cunoscut, permite scăderea erorilor induse de agitația
29 termică și identificarea elementelor de corecție în funcție de temperatură a raportului între
concentrația elementului de testat față de cel competițional ($[T]/[C]$);
 - 31 - pentru o accelerare a legării complementare se poate utiliza și o încălzire la o
temperatură cunoscută superioară celei a mediului înconjurător, ce poate simplifica și
33 utilizarea corecției în funcție de temperatură;
 - legarea pe bază de amprentă presupune existența unei singure molecule fixate (T
35 sau C) la nivelul unei amprente, sau identificarea și corectarea erorilor date de legarea de
două sau mai multe molecule. Elementele de corecție utilizate sunt;
 - 37 - definirea unor elemente de predictibilitate de dispoziție spațială a detec-
torului (D) de tip array permite identificarea legărilor nespecifice (în afara zonelor țintă);
 - 39 - identificarea raporturilor de concentrație între țintă și elementele
competiționale ($[T]/[C]$) este dependentă de existența unui număr de detectori (D) dar nu
41 necesită un număr foarte mare de detectori. În acest sens se pot utiliza zone de depunere
a detectorului (D) ce au risc minim de a prezenta doi detectori (D) chiar dacă avem zone fără
43 nici un detector (D);
 - identificarea legării de două elemente (T și/sau C) datorită existenței a doi
45 detectori (D) în zona țintă se realizează prin evidențierea existenței unei forme alungite a
ampreței, cu impunerea unui prag experimental între raportul diametrului maxim și cel
47 minim al ampreței pentru validarea digitală.

RO 134652 B1

- identificarea legării de mai multe elemente (T și/sau C) datorită existenței a mai mulți detectori (D) în zona țintă se realizează prin evidențierea existenței de amprente cu dimensiune în afara limitelor de digitalizare. În mod similar se pot invalida legările nespecifice;	1 3
- 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;	5
- pentru detecția de multiple ținte 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 (1) ce pot fi cuantificate redundant, 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) fata de cele asociate detecției, folosind alte lungimi de undă, sau model de fluorescență (de exemplu liniar în loc de circular).	7 9 11 13
Nu cunoaștem existența unei soluții similare realizată sau brevetată până la ora actuală.	15
Invenția prezintă următoarele avantaje:	17
- prin evaluarea amprentei elementelor de cuantificat în funcție de amprenta pe care o lasă pe suprafața deformabilă, corelat cu utilizarea unor elemente de cuantificat distanțele (de tip FRET) față de suprafața relativ rigidă, se realizează o cuantificare facilă a unei amprente mult mai mari comparativ cu elementele cuantificate, ceea ce simplifică elementele optice utilizate în evaluarea individuală a fiecărei amprente, cu digitalizarea infomației și corectarea de erori induse de factori de mediu;	19 21 23
- prin utilizarea unor consumabile de natură celor prezentate folosind metodologia asociată se pot utiliza dispozitive medicale ce utilizează elemente optice, mecanice și electronice simple, având:	25
- costuri reduce;	27
- dimensiuni reduce (apropiate de ale unui telefon mobil);	
- accesibilitate ridicată pentru aplicații medicale, industriale și științifice;	29
- portabilitate.	
- utilizarea unei analize de tip statistic online permite identificarea în timp real a situației medicale și epidemiologice, cu o creștere a accesibilității la servicii medicale în contextul unui impact economic negativ minim. Asociat cu un cost redus, se obține astfel:	31 33
- eficientizarea distanțării sociale moderate prin utilizarea diagnosticării prin detecție de tip screening în masă repetat periodic, în vederea funcționării economiei și în caz de pandemie;	35
- răspuns centralizat la amenințări pentru care nu se cunosc elemente statistice particulare (cu obținerea lor în timp real);	37
- evaluări de tip screening ce pot reduce impactul economic al tratării întregii populații;	39
- identificarea riscurilor de apariție a rezistenței la antibiotic, cu evidențierea soluțiilor alternative la nivel local;	41
- identificarea riscurilor personale de îmbolnăvire în vederea prevenției și utilizării acestora de către firmele de asigurări de sănătate sau de către organisme guvernamentale, în vedere alocării de resurse, convingerii schimbării stilului de viață, utilizării de metode compensatorii (de tip taxare suplimentară), în vederea scăderii costurilor generale asociate asigurării accesului la sănătate;	43 45 47

RO 134652 B1

1 - utilizarea dispozitivelor de către personal mediu instruit în utilizarea acestora;
2 - identificarea și prevenirea fraudelor economice privind exploatarea și
3 comercializarea produselor biologice (alimentare și non-alimentare);
4 - identificarea și prevenirea comercializării produselor biologice (alimentare
5 și non-alimentare) din arii protejate;
6 - prevenirea riscurilor de accidente (prin identificarea factorilor asociați, cum
7 ar fi hormonii de stres);
8 - identificarea centralizată a riscurilor infraționale prin detecția profilului
9 biologic (cum ar fi de exemplu la accesul în infrastructuri critice).

Prezentarea, pe scurt, a figurilor din desene:

10 - fig. 1, prezintă schema constructivă a elementelor active în detecția și cuantificarea
11 elementelor de testat: (1) Structura parțial nedeformabilă transparentă; (2) Spațiul de reacție
12 subțire de tip microfluidic; (3) Suprafața deformabilă; (4) Sistem de aplicare presiune asupra
13 suprafeței deformabile; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET; (F2) Fluorofor 2 din perechea
14 FRET; (D) Elemente de detecție (de exemplu anticorpi);

15 - fig. 2, prezintă schema funcțională de descriere a mecanismului de funcționare,
16 respectiv legarea competițională: (1) Structura parțial nedeformabilă transparentă; (2) Spațiul
17 de reacție subțire de tip microfluidic; (3) Suprafața deformabilă; (4) Sistem de aplicare
18 presiune asupra suprafeței deformabile; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET; (F2) Fluorofor
19 2 din perechea FRET; (D) Elemente de detecție (de exemplu anticorpi); (T) Molecula țintă;
20 (C) Molecula competițională. Legarea competițională a moleculei țintă (T) sau a celei
21 competiționale (C) la elementele de detecție (D) se realizează aleator, în funcție de agitația
22 termică și de concentrațiile acestora ([T] și [C]);

23 - fig. 3, prezintă schema funcțională de descriere a mecanismului de funcționare,
24 respectiv deformarea suprafeței (membranei) sub acțiunea sistemului de aplicare a presiunii.
25 (1) Structura parțial nedeformabilă transparentă (2) Spațiul de reacție subțire de tip micro-
26 fluidic; (3) Suprafața deformabilă; (4) Sistem de aplicare presiune asupra suprafeței defor-
27 mabile; (F1) Fluorofor 1 din perechea FRET; (F2) Fluorofor 2 din perechea FRET; (D) Ele-
28 mente de detecție (de exemplu anticorpi); (T) Molecula țintă; (C) Molecula competițională.
29 (Amprenta T) Amprenta la suprafața structurii nedeformabile realizată de suprafața deforma-
30 bilă în jurul moleculei țintă (T), care îndeplinește condiția ca distanța dintre cele două supra-
31 fețe să fie mai mare decât cea necesară apariției fluorescenței FRET (între F1 și F2).
32 (Amprenta C) Amprenta la suprafața structurii nedeformabile realizată de suprafața defor-
33 mabilă în jurul moleculei competiționale (C), care îndeplinește condiția că distanța dintre cele
34 două suprafețe să fie mai mare decât cea necesară apariției fluorescenței FRET. Se observă
35 scăderea distanței dintre F1 și F2 cu obținerea fluorescenței FRET, în afara amprentelor T
36 și C. Se observă dimensiunile diferite ale amprentelor T și C, corelate cu dimensiunile T și
37 C;

38 - fig. 4, prezintă schema de ansamblu: (P) Sistem de recoltare probă; (SC) Recipient
39 ce conține soluția/suspensia de calibrare; (A) Sistem de amestecare; (ID) Sistem de
40 identificare (descriș în fig. 1...3); (S) Sistem de spălare; (DB) Recipient deșeuri biologice;
41 (SO) Sistemul optic de evaluare.

42 Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...4,
43 care prezintă:

44 - amestecarea în sistemul de amestec (A) (fig. 4) folosind volume egale (sau în raport
45 cunoscut) între proba de testat de la sistemul de recoltare probă (P) (fig. 4) și soluția de
46 calibrare din recipientul ce conține soluția/suspensia de calibrare (SC) (fig. 4);
47

RO 134652 B1

- injectarea în sistemul de identificare (ID) (fig. 4) unde se așteaptă o perioadă calibrată de timp, se măsoară și/sau se stabilește o temperatură peste cea a mediului înconjurător, pentru legarea prin complementaritate de elementele de detecție (D) (de exemplu anticorpi), molecula țintă (T) (de exemplu antigene fig. 2 și 3) și/sau molecula competițională (C); Aceasta din urmă (C) se află depozitată în concentrație cunoscută în recipientul soluției de calibrare (SC) (fig. 4);
- aplicarea unei presiuni de către sistemul de aplicare presiune (4) (fig. 1...3) asupra suprafeței deformabile (3) (fig. 1...3) ce se apropie de structura parțial nedeformabilă (1) (fig. 1...3) cu eliminarea elementelor rămase nefixate după reacție și spălare cu sistemul de spălare (S) (fig. 4);
- evaluarea deformării suprafeței deformabile (3) prin intermediul amprentei acestora (Amprenta T și Amprenta C) prin lipsa de fluorescență FRET asociată apropierii fluoroforilor (F1 și F2) în celelalte zone decât cele ale amprentelor (fig. 3);
- cuantificarea diametrului amprentelor și digitalizarea semnalului (O-nelegare, I-legare T, 2-Legare C) în funcție de grilele specifice perechii T-C concrete, și aplicarea altgoritmilor de corecție de erori.

Bibliografie

1. Lequin R. M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, Clin Chem. 2005 Dec. 51(12): 2415-8.
2. Hung J. H., Weng Z., *Analysis of Microarray and RNA-seq Expression Profiling Data*, Cold spring Harb Protoc. 2017 Mar 1; 2017(3).
3. Ramos-Vara J. A., *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 H. L., 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 C. B., Opal S. M., *Antibiotic Stewardship: Strategies to Minimize Antibiotic Resistance While Maximizing Antibiotic Effectiveness*, Med Clin North Am. 2018 sep; 102(5): 83.
9. Waseem H., Jameel S., Ali J., Saleem Ur Rehman H., Tauseef I., Farooq U., Jamal A., Ali M. I., *Contributions and Challenges of High Throughput qPCR for Determining Antimicrobial Resistance in the Environment: A Critical Review*, Molecules. 2019 Jan 3; 24(1).

Revendicări

1. Dispozitiv pentru analiza *in vitro* digitală codificată spațial a complementarității, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

- a) Un sistem de identificare (**ID**) cu structura stratificată care conține:
 - o suprafață nedeformabilă (**1**) transparentă pe suprafața căreia sunt dispuse, fără măsuri speciale de asigurare a uniformității, elemente de detecție imagistică de tip FRET fluorofori (**F1**) și, într-o matrice, elemente de detecție (**D**);
 - un spațiu de reacție (**2**) subțire de tip microfluidic;
 - o suprafață deformabilă (**3**) pe care sunt dispuse elemente de detecție imagistică de tip FRET fluorofori (**F2**), și
 - un sistem de aplicare presiune (**4**) asupra suprafeței deformabile (**3**), unde suprafața deformabilă (**3**) poate colaba spațial de reacție (**2**) și ajunge în contact cu suprafața nedeformabilă (**1**) sub acțiunea sistemului de aplicare presiune (**4**), determinând contactul între fluorofori (**F1**) și (**F2**) și se poate deforma la colabarea spațiului de reacție (**2**) în prezența elementelor de detecție (**D**) după ce acestea au reacționat cu moleculele țintă sau moleculele de competitor dintr-o soluție de probă sau o soluție de calibrare;
- b) un recipient ce conține o soluție sau o suspensie de calibrare (**SC**) având concentrația cunoscută de competitor (**C**);
- c) un sistem de recoltare probă (**P**) și prelucrare preliminară;
- d) un sistem de amestecare echivolumică sau în raport volumetric cunoscut a soluției sau suspensiei (**SC**) și a probei (**P**) și de injectare în spațiul de reacție (**2**);
- e) un sistem de spălare (**8**);
- f) recipiente de deșeuri biologice (**9**);
- g) un sistem de protecție a fluoroforilor având ferestre mobile;
- h) un sistem optic simplu (**11**);
- i) un sistem de analiză și control care controlează elementele optice, electronice și mecanice, realizează corecția de erori și comunică direct sau prin intermediul unui smartphone sau tabletă cu unitatea de integrare și analiza statistică a datelor.

2. Metodă de analiză *in vitro* digitală codificată spațial a complementarității care utilizează dispozitivul definit la revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde preluarea probei (**P**), care poate conține molecule țintă de analizat T, de către sistemul de recoltare probă (**6**), amestecarea acesteia echivolumic sau în raport volumetric cunoscut cu soluția sau suspensia de calibrare (**SC**) având o concentrație cunoscută de competitor (**C**) în sistemul de amestecare (**7**), urmată de injectarea amestecului obținut în spațiul de reacție (**2**) din sistemul de identificare (**ID**), unde se menține un timp calibrat la o temperatură necesară realizării reacției dintre elementele de detecție (**D**) și moleculele țintă (**T**) sau moleculele competitor (**C**), aplicarea unei presiuni cu ajutorul sistemului de aplicare presiune (**4**) asupra suprafeței deformabile (**3**), care se apropie de suprafața parțial nedeformabilă (**1**) pentru a obține contactul între fluoroforii (**F1**) de pe suprafața (**1**) și fluoroforii (**F2**) de pe suprafața (**3**), cu deformarea suprafeței deformabile (**3**) în dreptul structurilor chimice fixate de elementele de detecție (**D**) în urma reacției dintre elementele de detecție (**D**) și moleculele țintă (**T**) sau moleculele de competitor (**C**), cu realizarea de amprente diferite dimensional, și anume amprenta (**T**) pentru complexul (**T-D**) și respectiv amprenta (**C**) pentru complexul (**C-D**), obținerea imaginilor de fluorescență prin expunere la radiație, evaluarea deformării suprafeței deformabile (**3**) cu ajutorul amprentelor (**T**) și (**C**) prin fluorescență FRET asociată apropierea fluoroforilor (**F1**) și (**F2**) în celelalte zone de apropiere între suprafețele (**1**) și (**3**) decât ale amprentelor și, în final, digitalizarea semnalului de fluorescență obținut, astfel 0- nelegare, 1-legare T, 2-legare C și aplicarea unui altgoritm de corecție de erori.

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 21/64 (2006.01);

C12Q 1/00 (2006.01);

C12Q 1/68 (2006.01)

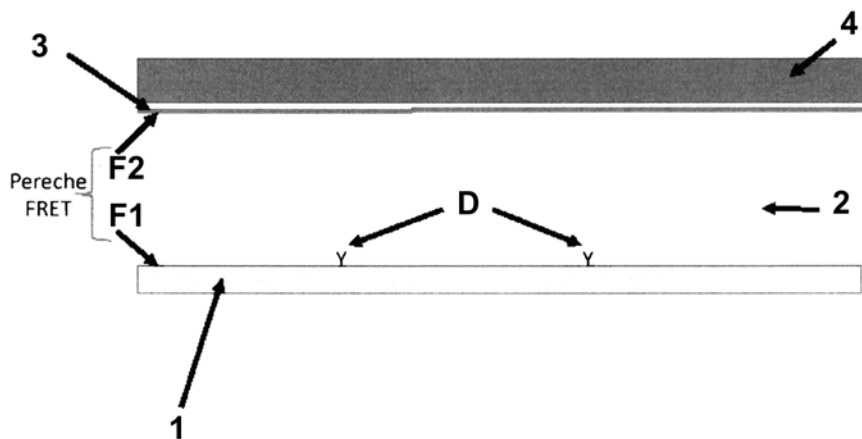


Fig. 1

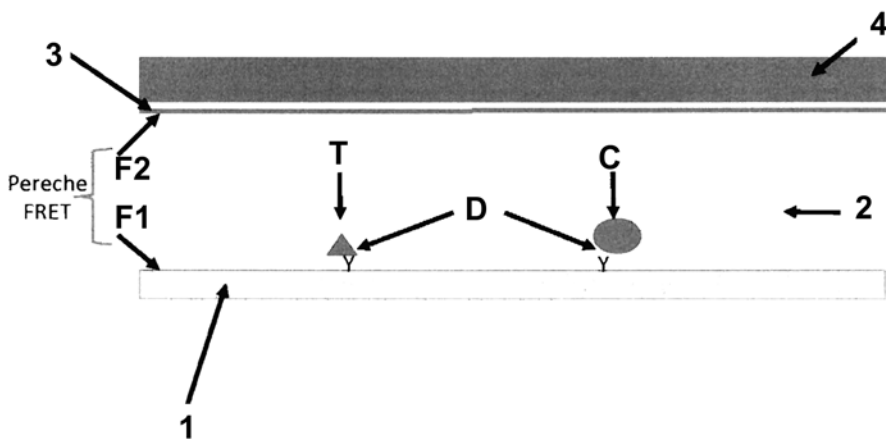


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);
G01N 21/64 (2006.01);
C12Q 1/00 (2006.01);
C12Q 1/68 (2006.01)

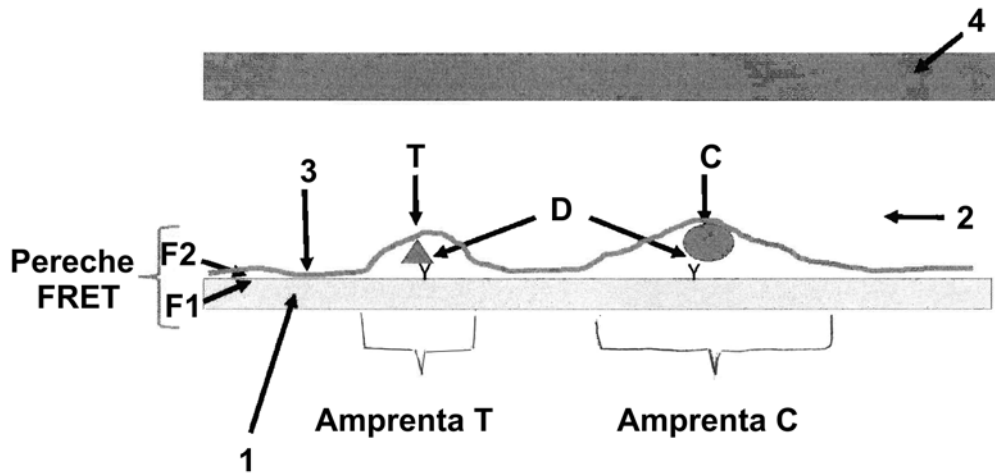


Fig. 3

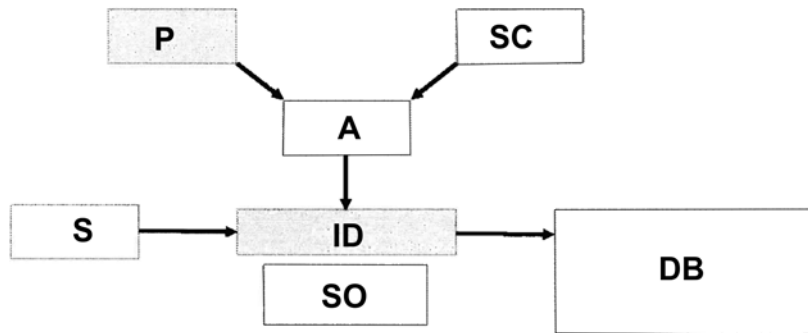


Fig. 4

