



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00778**

(22) Data de depozit: **25/11/2020**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2023** BOPI nr. **10/2023**

(41) Data publicării cererii:
28/05/2021 BOPI nr. **5/2021**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA**,
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI MOLECULARE**, *STR.DONAT NR.67-103, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO*

(72) Inventatori:
• **POTARA MONICA**, *STR.POET GR. ALEXANDRESCU, NR.29, AP.24, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*
• **AȘTILEAN SIMION**, *CALEA MANĂȘTUR, NR.99, AP.39, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*
• **TURCU IOAN**, *STR.TITU MAIORESCU, NR.7, AP.4, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;*
• **SZOKE-NAGY TIBERIU**, *STR.IOSIF VULCAN NR.3, AP.1, BISTRIȚA, BN, RO;*

• **JAKAB ENDRE**, *STR.ULIULUI, NR.7, BL.D, AP.15, BACIU, CJ, RO;*
• **JAKAB REKA ILONA**, *NR.1072D, SAT PRAID, COMUNA PRAID, HR, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
M. POTARA, E.JAKAB, A. DAMERT, O. POPESCU, V. CANPEAN, S. ASTILEAN, "SYNERGISTIC ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN - SILVER NANOCOMPOSITES ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS", *NANOTECHNOLOGY, VOL. 22, P. 135101, 2011; M. POTARA, D. MANIU, S. ASTILEAN*, "THE SYNTHESIS OF BIOCOMPATIBLE AND SERS-ACTIVE GOLD NANOPARTICLES USING CHITOSAN", *NANOTECHNOLOGY, VOL. 20, 315602, 2009; KR 20150000594 A; XIA ZHOU ȘI COLAB.*, "BACTERIA DETECTION: FROM POWERFUL SERS TO ITS ADVANCED COMPATIBLE TECHNIQUES", *ADVANCED SCIENCE, NR. 23, VOL. 7, P. 2001739, 2020*

(54) **METODĂ RAPIDĂ DE DETECȚIE A BACTERIILOR PATOGENE PRIN SPECTROSCOPIE SERS**



RO 134994 B1

1 Invenția se referă la o metodă rapidă (~ 30 min) de detecție a bacteriilor patogene din
diferite medii apoase, pe baza spectrelor vibraționale măsurate prin spectroscopie Raman
3 amplificată de suprafață (surface enhanced Raman spectroscopy - SERS).

5 Invenția este aplicabilă pentru detecția și identificarea bacteriilor patogene în mediul
înconjurător (exemplu: apă potabilă, apa din lacuri, râuri sau piscine) sau mediul spitalicesc
atât din probe lichide, cât și de pe diferite suprafețe.

7 Contaminarea cu microorganisme patogene (bacterii, virusuri) reprezintă una dintre
cele mai proeminente probleme cu care se confruntă omenirea la începutul acestui mileniu.
9 În condițiile în care tot mai multe tipuri de bacterii dezvoltă rezistență la metodele tradiționale
de tratament, elaborarea unor metode capabile să detecteze, identifice și monitorizeze rapid
11 contaminanții microbieni a devenit un obiectiv extrem de important în contextul sănătății
publice (**N. J. Ashbolt, Curr Envir Health Rpt (2015) 2, 95-106**). Metodele tradiționale de
13 detecție (ELISA, PCR etc.) sunt complicate, consumatoare de timp și presupun costuri
ridicate (**S. Umesha, H. M. Manukumar, Crit Rev Food Sci Nutr (2018) 58, 84-104**).
15 Spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este potrivită pentru dezvoltarea unor
strategii de detecție eficiente, cu timp rapid de răspuns, cost redus de fabricare și porta-
17 bilitate ridicată, fiind astfel o alternativă avantajoasă la metodele clasice de detecție (**Y. Liu,
H. Zhou, Z. Hu, G. Yu, D. Yang, J. Zhao, Biosens Bioelectron (2017) 94, 131-140**). Totuși,
19 implementarea cu succes a acestei metode pentru detecția microorganismelor patogene este
condiționată în mod critic de utilizarea unui substrat SERS robust, stabil și reproductibil.
21 Efectul SERS are la bază un mecanism de natură electromagnetică care conduce la
amplificarea spectrului vibrațional al unei molecule care se găsește în contact cu o suprafață
23 metalică nanostructurată în anumite configurații sau „puncte fierbinți” (hot-spoturi).
Substratele SERS pe suport solid permit un control ridicat al distribuției de puncte fierbinți
25 necesare pentru amplificarea semnalului Raman și prezintă avantajul reproductibilității în
preparare. Totuși, de multe ori prepararea acestor tipuri de substrate presupune costuri
27 ridicate și procedee complicate. Mai mult, aceste tipuri de substrate sunt în general adaptate
pentru probe lichide. Suspensiile coloidale de nanoparticule de metal nobil prezintă o serie
29 de avantaje pentru astfel de aplicații, cele mai importante fiind flexibilitate în implementare
pentru diferite tipuri de probe (lichide, suprafețe), cost redus și reproductibilitate în preparare,
31 stabilitate în timp (**P. A. Mosier-Boss, Biosensors, (2017), 7, 51**). S-a demonstrat ca
biopolimerul chitosan prezintă o afinitate ridicată față de un spectru larg de bacterii, având
33 capacitatea de a se atașa de membrana acestora datorită interacțiunilor electrostatice dintre
grupările amino pozitive din lanțul polimeric și suprafața predominant negativă a membranei
35 bacteriene. Această proprietate a fost exploatată cu succes pentru detecția colorimetrică a
bacteriilor utilizând nanoparticule magnetice învelite în chitosan (**T. N. Le, T. D. Tran, M.
37 IiKim, Nanomaterials (2020) 10, 92**).

39 Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de a detecta rapid
bacteriile patogene din mediul înconjurător sau mediul spitalicesc atât din probe lichide, cât
și de pe diferite suprafețe

41 Invenția are ca obiect o metodă de detecție a stafilococului auriu sau a enterococului
fecal din medii apoase prin spectroscopie SERS care constă în depunerea unei probe de
43 ordinul microlitrilor colectate din mediul apos pe un substrat activ SERS reprezentat de
nanoparticule coloidale de aur învelite în chitosan, achiziția spectrelor SERS atât pentru
45 proba cu substrat activ SERS cât și numai pentru substratul activ fără probă, identificarea
profilului spectral al stafilococului auriu sau al enterococului fecal prin analiza spectrelor
47 SERS, realizarea hărților de distribuție a stafilococului auriu sau a enterococului fecal.

RO 134994 B1

Noutatea invenției constă în utilizarea nanoparticulelor coloidale de aur învelite în chitosan în combinație cu spectroscopia și imagistica SERS pentru captarea agentului patogen din diferite medii, identificarea acestuia prin semnătura Raman specifică și "vizualizarea" distribuției acestuia pe suprafața contaminată prin reprezentarea hărților SERS.	1 3 5
Metoda de detecție conform invenției de față presupune realizarea următorilor pași:	
- colectarea unei probe (de ordinul microlitrilor) din mediul apos conținând agentul patogen și depunerea probei pe substratul activ SERS;	7
- achiziția spectrelor SERS atât local, cât și prin scanarea substratului SERS;	9
- identificarea profilului spectral al agentului patogen prin analiza spectrelor SERS;	
- realizarea hărților de distribuție a agentului patogen pe suprafață;	11
Avantajele metodei de detecție a bacteriilor patogene conform invenției de față sunt următoarele:	13
- flexibilitate în implementare: metoda este funcțională și aplicabilă în mai multe variante de lucru: (i) picurarea pe substrat de sticlă a agentului patogen (2 μl), uscarea la temperatura camerei, urmată de picurarea soluției coloidale (2 μl) peste picătura uscată de agent patogen și apoi uscarea la temperatura camerei; (ii) incubarea agentului patogen în suspensia coloidală de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2 μl), urmată de picurarea amestecului pe substrat de sticlă (2 μl), urmată de uscarea la temperatura camerei; (iii) picurarea pe substrat de sticlă a soluției coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2 μl), uscarea la temperatura camerei, urmată de picurarea agentului patogen (2 μl) peste picătura uscată de nanoparticule de aur și apoi uscarea la temperatura camerei;	15 17 19 21
- rapiditate în detecție (~ 30 min);	23
- necesită volume mici de probă (~ 2 μl);	
- cost redus de fabricare a substratului SERS;	25
- reproductibilitate și stabilitate.	
Desene	27
Fig. 1, spectrul de extincție UV-vis (A) și potențialul zeta (B) al suspensiei coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan.	29
Fig. 2, (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând <i>S. aureus</i> suspendat în apă distilată, iar a doua suspensia coloidală; (B) Spectre SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii uscate; (C) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm ⁻¹ pe suprafața scanată; (D) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din fig. C peste imaginea microscopică din fig. A; (E) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).	31 33 35
Fig. 3, (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând <i>E. faecalis</i> suspendat în apă distilată, iar a doua suspensia coloidală; (B) Spectre SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii uscate; (C) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm ⁻¹ pe suprafața scanată; (D) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din fig. C peste imaginea microscopică din fig. A; (E) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).	37 39 41 43
Fig. 4, (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea succesivă a două picături, prima conținând <i>S. aureus</i> suspendat în apă de la robinet, iar a doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm ⁻¹ pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din fig. B peste imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).	45 47 49

1 Fig. 5. (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea
succesivă a două picături, prima conținând *E. faecalis* suspendat în apă de la robinet, iar a
3 doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității
benzii de la 734 cm^{-1} pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapu-
5 nerea hărții SERS din fig. B peste imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul SERS
mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase
7 din harta SERS (b, c d).

8 Fig. 6. (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea
succesivă a două picături, prima conținând *S. aureus* suspendat în mediu de cultură, iar a
9 doua suspensia coloidală; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității
benzii de la 734 cm^{-1} pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapu-
11 nerea hărții SERS din fig. B peste imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul SERS
mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase
13 din harta SERS (b, c d).

14 Fig. 7. (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscare după depunerea
succesivă a două picături, prima conținând suspensia coloidală, iar a doua *S. aureus*
17 suspendat în mediu de cultură; (B) Harta SERS obținută prin reprezentarea variației
intensității benzii de la 734 cm^{-1} pe suprafața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin
19 suprapunerea hărții SERS din fig. B peste imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul
SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre SERS extrase din diferite spoturi
21 luminoase din harta SERS (b, c d).

22 Fig. 8. (A), imaginea microscopică a substratului rezultat prin uscarea unei picături
de suspensie coloidală incubată în prealabil cu *S. aureus* suspendat în apă distilată; (B)
23 Harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm^{-1} pe supra-
fața scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din fig. B peste
25 imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a)
și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c d).
27

28 Fig. 9. (A), imaginea microscopică a unei picături uscate de suspensie de nanopar-
ticule de aur învelite în chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen); (B) Harta
29 SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm^{-1} pe suprafața
scanată; (C) Imagine combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS din fig. B peste
31 imaginea microscopică din fig. A; (D) Spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a)
și spectre SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c, d).
33

34 Primul pas constă în sintetizarea și caracterizarea nanoparticulelor coloidale de aur
învelite în chitosan. Protocolul de sinteză a suspensiei coloidale de nanoparticule de aur
35 învelite în chitosan constă în încălzirea la temperatura de 80°C sub agitare magnetică a unui
amestec de soluție apoasă de chitosan de masă moleculară mare (de concentrație 2 mg/ml ,
37 dizolvat în 1% acid acetic) și clorură aurică (HAuCl_4 de concentrație 10^{-3} M). Formarea
nanoparticulelor de aur este evidențiată vizual prin modificarea în timp a culorii amestecului
39 de la incolor la roz și apoi roșu. După finalizarea reacției de sinteză suspensia coloidală se
răcește la temperatura camerei. Soluția coloidală se păstrează în frigider, fiind stabilă pe
41 durată îndelungată (cel puțin un an). În vederea măsurătorilor SERS este necesară
îndepărtarea excesului de chitosan și concentrarea suspensiei coloidale prin două etape de
43 centrifugare timp de 10 min la 8000 rpm fiecare și resuspendare în apă bidistilată. Pro-
prietățile optice ale nanoparticulelor sintetizate au fost investigate prin măsurători spectro-
45 scopice de extincție UV-vis. Spectrele de extincție UV-vis ale suspensiei coloidale au fost
înregistrate cu spectrofotometrul Jasco V-670 UV-Vis-NiR cu rezoluția spectrală de 1 nm.
47

Pentru măsurători s-au utilizat cuve de cuarț cu drumul optic de 2 mm. Suspensia coloidală obținută prezintă o singură bandă plasmonică localizată la 521 nm (fig. 1A) caracteristică nanoparticulelor de aur de formă sferică (K.P. Jain, I.H. El-Sayed, L.K. Seok, M.A. El-Sayed, *J Phys Chem B* (2006) 110, 7238-7248). Distribuția de potențial zeta a fost înregistrată la 25°C cu echipamentul Malvern Zetasizer Nano ZS-90, obținându-se o valoare a potențialului zeta de + 49 mV (fig. 2B).

În următorul pas au fost selectați și cultivați agenții patogeni. Am optat pentru două clase de bacterii patogene foarte răspândite în mediul spitalicesc, și anume stafilococul auriu (*Staphylococcus aureus* - *S. aureus*) și enterococul fecal (*Enterococcus faecalis* - *E. faecalis*). Pentru obținerea preculturilor bacteriene, alicote conținând tulpinile bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* depozitate la -80°C au fost dezghețate parțial pe gheață la temperatura camerei. După dezghețarea parțială a probelor, 1 μl suspensie bacteriană a fost transferat folosind o spatulă sterilă într-un nou tub conținând 5 ml mediu lichid LB (Luria Broth), autoclavat în prealabil. După inoculare, probele au fost incubate peste noapte la 37°C. În vederea obținerii culturilor bacteriene pure, 10 μl din cultura bacteriană crescută peste noapte au fost transferați peste 990 μl tampon salin (NaCl 0,9%) sterilizat în prealabil prin autoclavare. În acest fel s-a obținut diluția de 10⁻² (diluarea probei inițiale de 100 de ori).

Ulterior din proba rezultată s-au transferat alți 100 μl peste 900 μl tampon salin, procedeul repetându-se până la obținerea diluțiilor de 10⁻⁵, 10⁻⁶ și 10⁻⁷. Ulterior 500 μl din diluțiile 10⁻⁵, 10⁻⁶ and 10⁻⁷ au fost transferați imediat pe mediu solid LB cu agar. După etalarea probei pe mediu de cultură, proba a fost incubată 15 min la temperatura camerei iar după aceea plăcile Petri au fost incubate la 37°C peste noapte (cel puțin 20 h). În vederea măsurătorilor SERS, coloniile bacteriene de pe plăcile Petri incubate peste noapte au fost selectate cu ansa, și resuspendate după caz în mediu lichid LB sau apă distilată, sterilizate în prealabil prin autoclavare. Coloniile bacteriene au fost resuspendate în mediul dorit până la o densitate optică echivalentă cu standardul 2 McFarland. Standardul de 2 McFarland este echivalentul unei concentrații bacteriene având o densitate relativă a celulelor de 6 x 10⁸ CFU (Unități formatoare de colonii) x ml⁻¹. După obținerea densității dorite, probele au fost transferate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și păstrate la 4°C pentru analizele ulterioare.

Pasul următor a constat în picurarea pe plăcuțe de sticlă a unui volum mic (2 μl) de agent patogen (*S. aureus* sau *E. faecalis*) suspendat în apă distilată și uscarea la temperatura camerei. Peste picătura uscată de agent patogen a fost apoi picurată o soluție coloidală de nanoparticule sferice de aur învelite în chitosan (2 μl) urmată de uscarea la temperatura camerei. Măsurătorile SERS au fost realizate cu Microscopul Raman Confocal Alpha300R Witec GmbH, Ulm, Germania. Probele au fost excitate cu linia 633 nm emisă de un laser He-Ne, lumina fiind focalizată pe suprafața picăturii uscate printr-un obiectiv cu mărirea 100 X și apertura numerică NA = 0,9. Puterea laser la ieșirea din obiectiv a fost 4,5 mW. Lumina împrăștiată Raman a fost colectată printr-o fibră optică de 100 μm diametru și transmisă spre analiză la un spectrometru echipat cu o cameră CDD (1024 X 128 pixeli, DV401-BV, Andor) care operează la -60°C. Imaginile microscopice ale picăturilor uscate au fost capturate cu o cameră video color a aceluiași microscop, folosind pentru iluminare o sursă LED cu lumină albă. Pentru analiza spectrală și prelucrarea imaginilor a fost utilizat software-ul Witec Project Four Plus. Inițial au fost colectate spectre SERS din diferite spoturi de pe suprafața picăturilor uscate. Spectrele au fost înregistrate cu un timp de integrare de 10 s/spectru. Ulterior s-au selectat mai multe arii (20 μm x 20 μm) de pe suprafața picăturii uscate care au fost „scanate” spectroscopic prin colectarea spectrelor SERS spot cu spot (40 puncte x 40 linii) cu timpul de integrare de 0,5 s/spectru. Precizăm că în aceste condiții o scanare durează 15 min. Prin reprezentarea variației intensității unei benzi Raman specifice agentului patogen pe suprafața scanată, am obținut așa numitele hărți SERS prin care am vizualizat indirect

1 prezența și distribuția bacteriilor pe suprafața de sticlă. Practic se realizează un contrast între
2 zonele fără bacterii (zonele întunecate) și respectiv zonele cu bacterii (zonele luminoase).
3 Prin analiza spectrelor SERS am identificat profilul biochimic al agentului patogen. Pentru
4 control am utilizat o picătură uscată de soluție coloidală de nanoparticule de aur învelite în
5 chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen) preparată și scanată în condiții
6 similare cu cele descrise mai sus.

7 În fig. 2A este prezentată imaginea microscopică a unei picături uscate de nano-
8 particule de aur învelite în chitosan depusă peste picătura uscată de *S. aureus*. Spectrele
9 SERS colectate din diferite spoturi de pe suprafața picăturii prezentate în fig. 2B facilitează
10 identificarea agentului patogen *S. aureus*. Interpretarea benzilor SERS caracteristice
11 *S. aureus* a fost făcută în acord cu datele din literatură (X. Chen, M. Tang, Y. Liu, J. Huang,
12 Z. Liu, H. Tian, Y. Zheng, M. Lamy de la Chapelle, Y. Zhang, W. Fu, *Microchimica Acta*
13 (2019) 186, 102). Harta SERS în fig. 2C realizată prin reprezentarea variației intensității
14 benzii de la 734 cm^{-1} pe suprafața scanată facilitează vizualizarea distribuției agentului
15 patogen *S. aureus* pe suprafața de sticlă. Imaginea combinată prezentată în fig. 2D realizată
16 prin suprapunerea hărții SERS din fig. C peste imaginea microscopică din fig. A permite
17 vizualizarea zonei scanate de pe suprafața picăturii uscate. În fig. 2E este prezentat spectrul
18 SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și, respectiv, spectre SERS extrase din diferite
19 spoturi luminoase din harta SERS (b, c d). Menționăm că spectrul mediu (spectrul a) este
20 obținut din media tuturor spectrelor înregistrate pe suprafața scanată (atât din zonele
21 luminoase, cât și din zonele întunecate, fără semnal SERS) ceea ce face ca intensitatea
22 semnalului să fie mai mică în comparație cu semnalul corespunzător zonelor luminoase
23 (spectrele b, c și d). Pentru o mai bună comparație, spectrul a fost înmulțit cu patru (x 4).

24 În mod similar am procedat la identificarea și vizualizarea distribuției pe suprafața de
25 sticlă a unui alt agent patogen, *E. faecalis*, rezultatele fiind prezentate în fig. 3.

26 Metoda de detecție conform patentului de față este aplicabilă pentru detecția și
27 identificarea bacteriilor patogene din diferite medii (apa distilată, apa de la robinet, mediul
28 de cultură a bacteriilor). Detecția și identificarea bacteriilor patogene din apa de la robinet
29 este prezentată în fig. 4 (*S. aureus*) și fig. 5 (*E. faecalis*). Rezultatele privind detecția *S.*
30 *aureus* din mediul de cultură sunt prezentate în fig. 6. Remarcăm că proteinele prezente în
31 mediul de cultură nu împiedică captarea și detecția agentului patogen.

32 Unul dintre avantajele invenției de față este flexibilitatea în implementare, metoda de
33 detecție fiind funcțională și aplicabilă în mai multe variante de lucru. Fig. 7 prezintă detecția
34 *S. aureus* din mediul de cultură realizată prin picurarea pe substrat de sticlă a soluției
35 coloidale de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2 μl), uscarea la temperatura camerei,
36 urmată de picurarea agentului patogen (2 μl) peste picătura uscată de nanoparticule de aur
37 și apoi uscarea la temperatura camerei. O altă variantă de lucru presupune incubarea agen-
38 tului patogen în suspensia coloidală de nanoparticule de aur învelite în chitosan (2 μl),
39 urmată de picurarea amestecului pe substrat de sticlă (2 μl), urmată de uscarea la tempera-
40 tura camerei. Rezultatele sunt prezentate în fig. 8 pentru detecția *S. aureus* suspendat în apă
41 distilată.

42 În fig. 9 este prezentată imaginea microscopică a unei picături uscate de suspensie
43 de nanoparticule de aur învelite în chitosan (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen)
44 (A), harta SERS obținută prin reprezentarea variației intensității benzii de la 734 cm^{-1} pe
45 suprafața scanată (B), imaginea combinată realizată prin suprapunerea hărții SERS peste
46 imaginea microscopică (C), spectrul SERS mediu corespunzător hărții SERS (a) și spectre
47 SERS extrase din diferite spoturi luminoase din harta SERS (b, c, d) (D). Remarcăm că
48 proba control (fără a fi adusă în contact cu agentul patogen) nu prezintă semnal SERS
49 caracteristic care să se suprapună peste profilul spectral al agenților patogeni.

RO 134994 B1

Revendicare

1

Metodă de detecție a stafilococului auriu sau a enterococului fecal din medii apoase prin spectroscopie SERS, **caracterizată prin aceea că**, constă în depunerea unei probe de ordinul microlitrilor colectate din mediul apos pe un substrat activ SERS reprezentat de nanoparticule coloidale de aur învelite în chitosan, achiziția spectrelor SERS atât pentru proba cu substrat activ SERS cât și numai pentru substratul activ fără probă, identificarea profilului spectral al stafilococului auriu sau al enterococului fecal prin analiza spectrelor SERS, realizarea hărților de distribuție a stafilococului auriu sau a enterococului fecal.

3

5

7

9

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01);

C12Q 1/04 (2006.01);

B82Y 15/00 (2011.01)

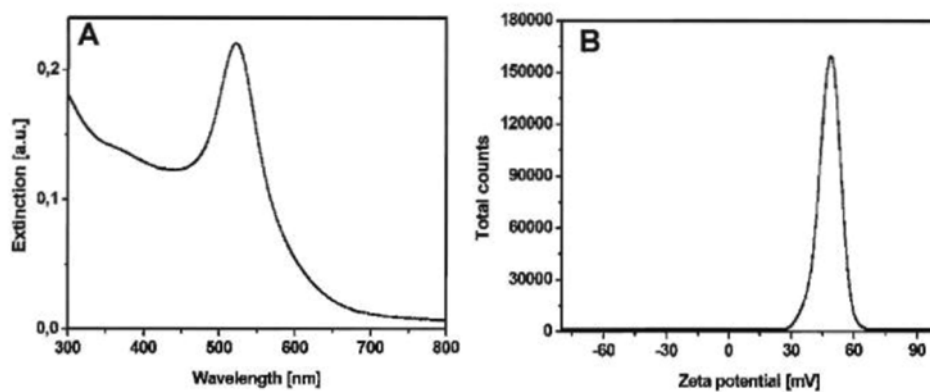


Fig. 1

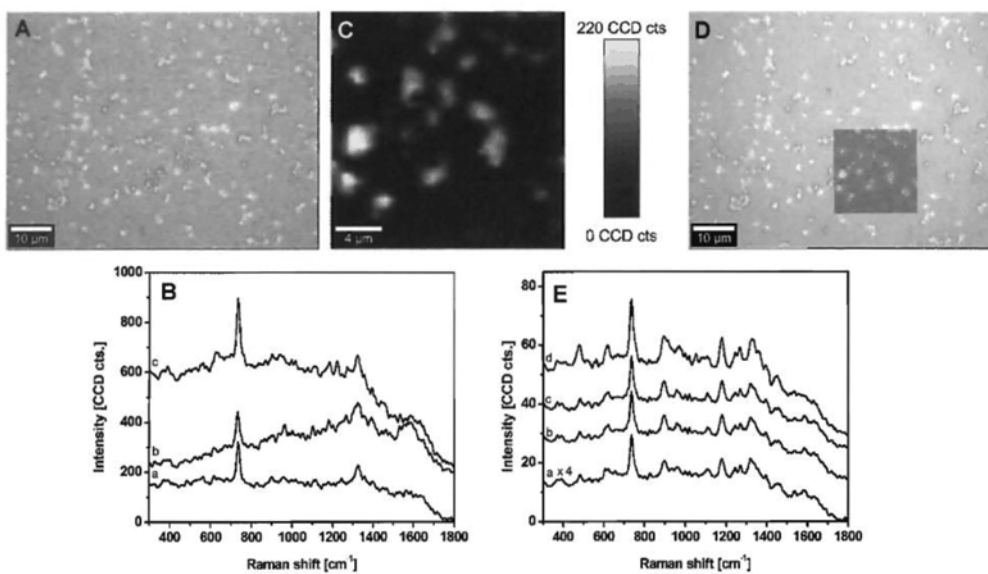


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01);

C12Q 1/04 (2006.01);

B82Y 15/00 (2011.01)

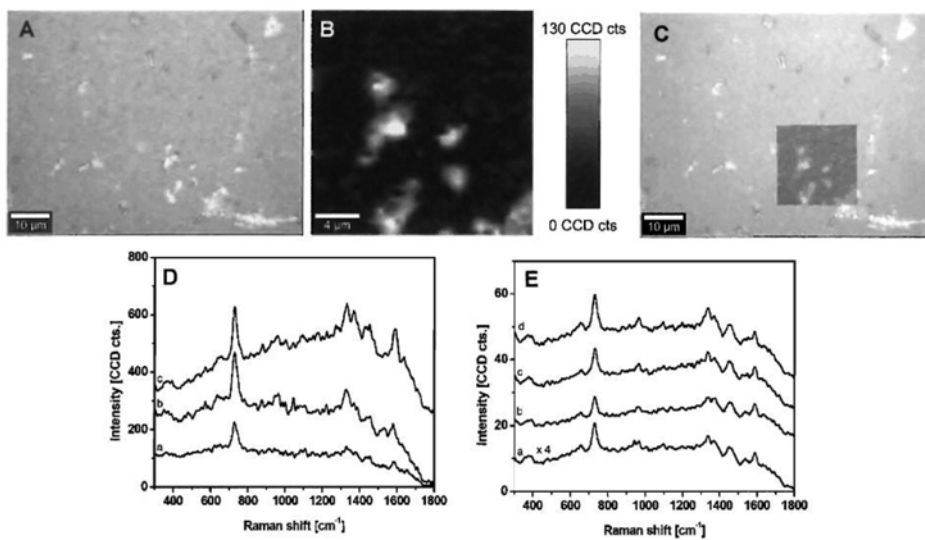


Fig. 3

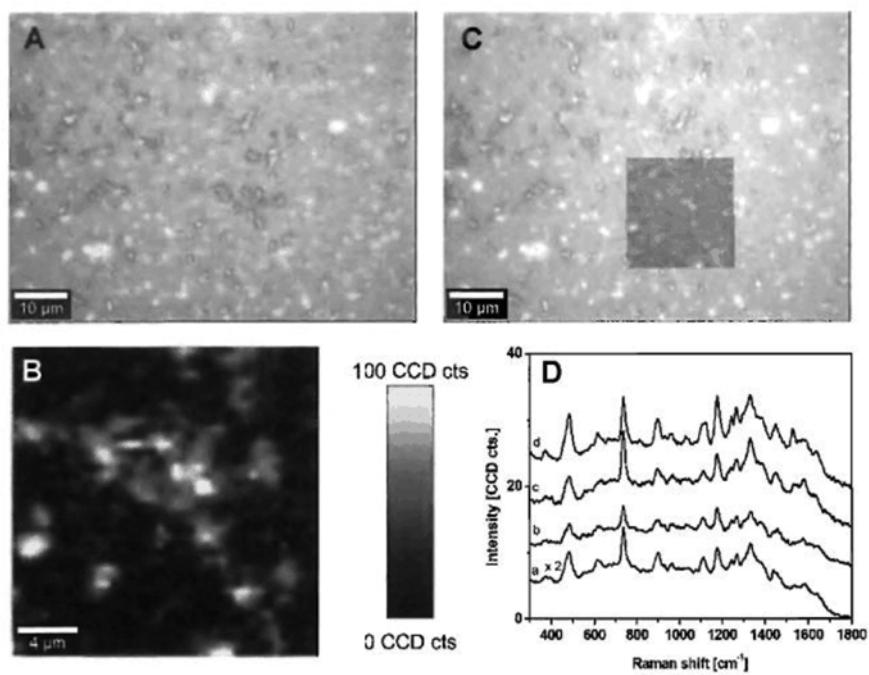


Fig. 4

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01);

C12Q 1/04 (2006.01);

B82Y 15/00 (2011.01)

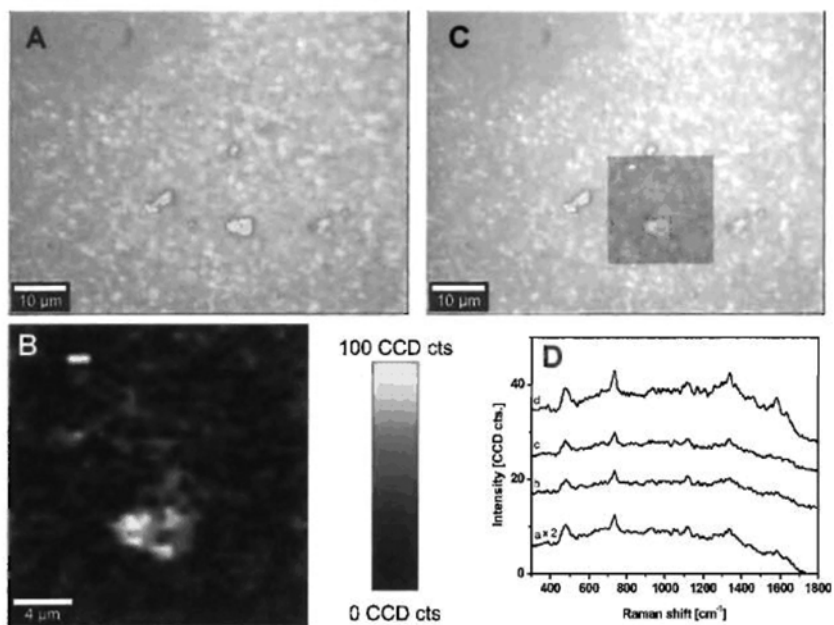


Fig. 5

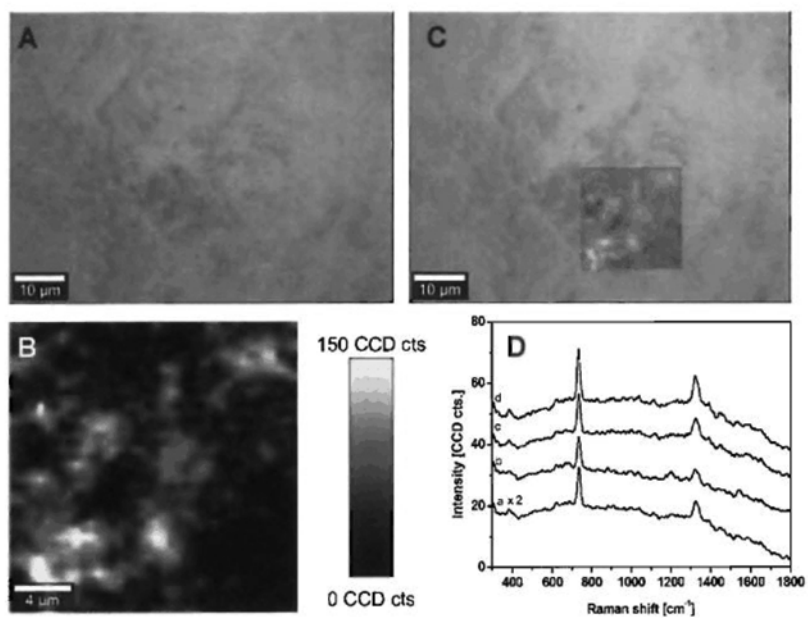


Fig. 6

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01);

C12Q 1/04 (2006.01);

B82Y 15/00 (2011.01)

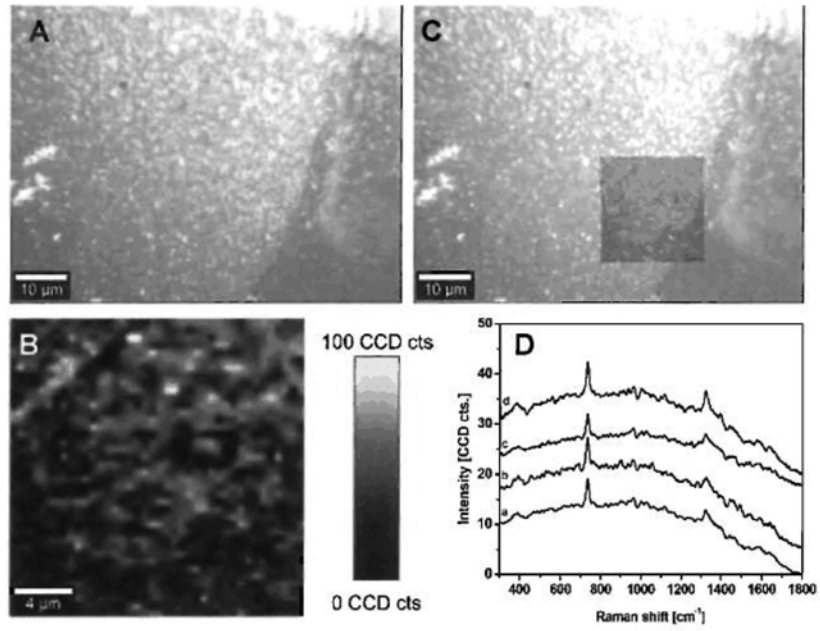


Fig. 7

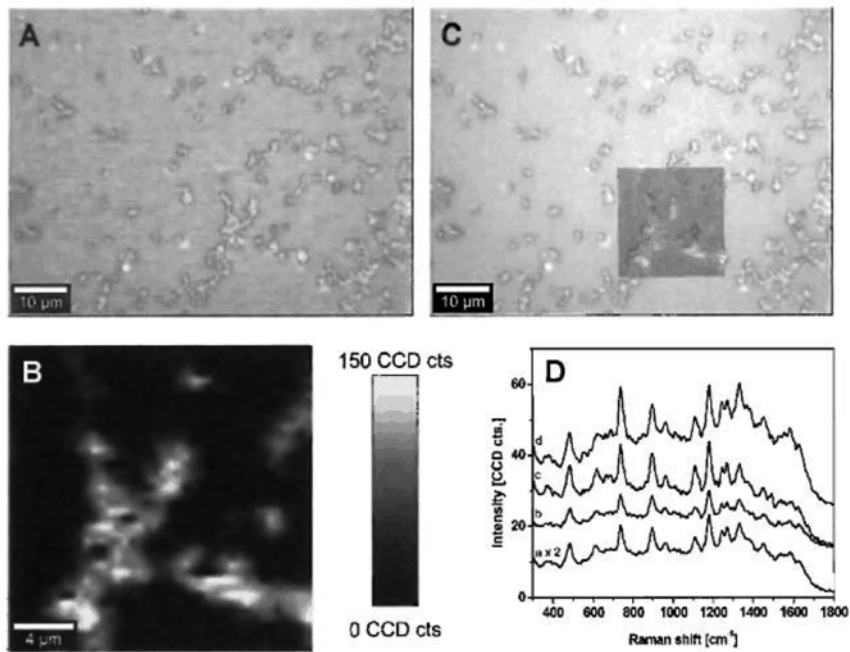


Fig. 8

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01);

C12Q 1/04 (2006.01);

B82Y 15/00 (2011.01)

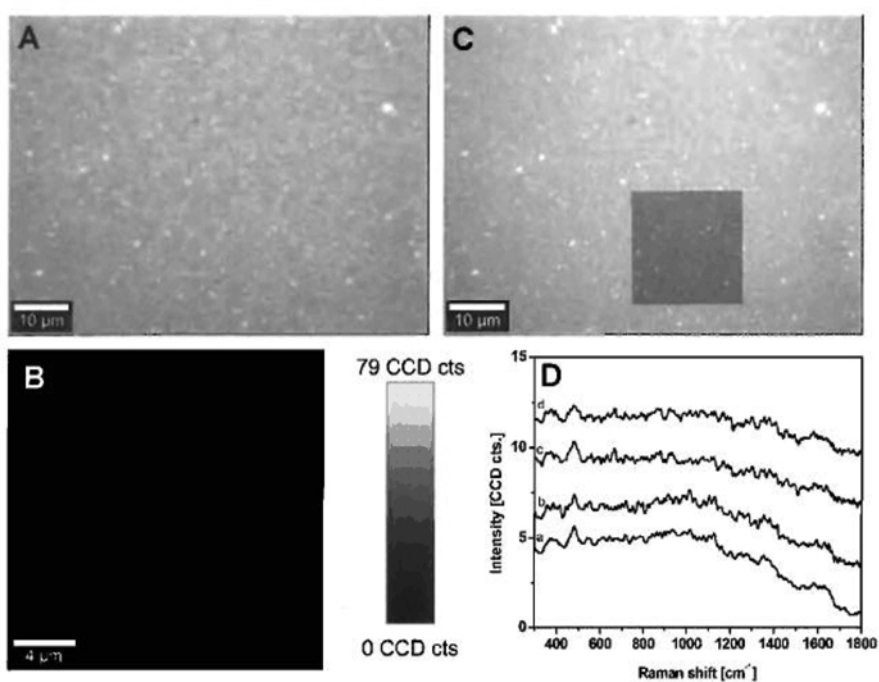


Fig. 9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 415/2023