



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00577

(22) Data de depozit: 14/09/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/03/2022 BOPI nr. 3/2022

(71) Solicitant:  
• CENTRUL INTERNAȚIONAL DE  
BIODINAMICĂ,  
INTRAREA PORTOCALELOR, NR.1B,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• GHEORGHIU EUGEN, BD. UNIRII NR.12,  
BL.7 C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• GHEORGHIU MIHAELA, BD. UNIRII  
NR. 12, BL.7C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE COLECTARE, IDENTIFICARE ȘI DE EVALUARE  
CANTITATIVĂ A CONCENTRAȚIEI ȘI CAPACITĂȚII DE  
INFECTARE A MICRO-ORGANISMELOR PATOGENE  
CU TRANSMITERE AEROGENĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de identificare și de evaluare cantitativă a concentrației și capacității de infectare a micro-organismelor patogene, cu transmitere aerogenă. Metoda, conform invenției, constă în colectarea micro-organismelor patogene cu un dispozitiv de tip pasture fixat pe fața internă a unei măști faciale, în regiunea în care fluxul de aer expirat este maxim, incluzând un hidrogel și particule magnetice funcționalizate care leagă specific micro-organismele

țintă eliberate către mască, în condițiile utilizării măștii timp de cel puțin 1 h, după care se analizează masca facială împreună cu dispozitivul într-o unitate mobilă de analize optice și/sau electrice, prin comparație cu modele teoretice sau referințe.

Revendicări: 16

Figuri: 2



|  |            |
|--|------------|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |            |
| Cerere de brevet de invenție             |            |
| Nr. ....                                 | 26200577   |
| Data depozit .....                       | 14-09-2020 |

**Metodă de colectare, identificare și de evaluare cantitativă a concentrației și capacității de infectare a micro-organismelor patogene cu transmitere aerogenă**  
**DESCRIERE**

Invenția se referă la o metodă de colectare, identificare și de evaluare cantitativă a concentrației și capacității de infectare a micro-organismelor patogene, cu transmitere aerogenă care are la bază colectarea acestora într-un dispozitiv care poate fi fixat pe o mască facială, fără afectarea utilizatorului. După utilizarea măștii faciale, dispozitivul este analizat într-o unitate mobilă (inclusiv un telefon inteligent), prin metode electrice, optice sau electro-optice.

Metoda are aplicații practice în diagnosticarea atât a micro-organismelor celulare (bacterii sau fungi), cât și a virusurilor. În scopul controlului/limitării pandemiei COVID-19 o metodă rapidă, simplă, și ieftină de testare în masă a populației este extrem de urgentă.

În prezent, testarea populației, de referință pentru diagnosticul specific de COVID-19, respectiv al virusului SARS-CoV-2, se realizează prin colectarea cu tampoane speciale a probelor nazale și utilizarea metodelor moleculare, de exemplu Real Time PCR (RT-PCR), care detectează virusul prin tehnici de amplificare a materialului genetic viral în laboratoare specializate. Această metodă implică echipe și produse specifice de prelevare/colectare, proceduri care afectează indivizii testați și presupun accesul atât la sisteme PCR și reactivi al căror preț este ridicat, precum și la personal calificat, nefiind compatibilă cu utilizarea în unități mobile, autoprelevarea sau auto-testarea. Totodată, identificarea SARS-CoV-2 prin metode genetice nu oferă și informații cu privire la infectivitatea virusurilor. Astfel, este posibil ca rezultatul testului PCR să fie pozitiv deși virusul a fost inactivat, respectiv a pierdut capacitatea de a infecta.

În aplicația de brevet US 63000977/2020- se descrie o metodă de detecție a virusurilor bazată pe utilizarea de polimeri imprențați molecular (MIP) asociată utilizării unei măști faciale cu indicarea prezenței, capturii virusului țintă, printr-o reacție de culoare.

Dezavantajul principal al metodei și sistemelor descrise constă în faptul că nu permit evaluarea infectivității virusurilor și necesită laboratoare specializate pentru testare, respectiv pentru detecția semnalului specific micro-organismelor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea că utilizează un dispozitiv de tip plasture care poate fi fixat pe o mască facială, în regiunea în care fluxul de aer expirat este maxim, ca să elimine etapele secvențiale de colectare și analiză a probelor de la persoanele testate conform protocoalelor de evaluare și testare epidemiologică. Alternativ, dispozitivul poate fi montat în circuitul de condiționare sau/și filtrare a aerului dintr-o încăpere. Dispozitivul de tip plasture include în configurații predefinite un hidrogel și particule raportoare naturale și/sau sintetice care leagă specific micro-organisme țintă eliberate către mască în condițiile utilizării normale a măștii timp de cel puțin o oră, proces care conduce la colectarea micro-organismelor prezente și la generarea unui răspuns specific evaluat fără implicarea unui personal sau laborator dedicate, prin metode electrice, optice sau electro-optice, într-o unitate mobilă. Particule raportoare naturale sunt celule vii (care prezintă la nivelul membranei celulare receptori specifici și permit infectarea, inclusiv multiplicarea intracelulară a micro-organismelor țintă) iar cele sintetice sunt particule (inclusiv magnetice) funcționalizate cu receptori sau/și compuși afini, de exemplu anticorpi care leagă specific micro-organismul țintă prezent în plasture. În urma colectării micro-organismelor particulele raportoare suferă modificări (ex. formarea de agregate) ale căror caracteristici sunt funcție de concentrația și infectivitatea micro-organismelor respective și permit evaluarea cantitativă în unități mobile, sau prin utilizarea telefoanelor inteligente.

Analiza în unități mobile a dispozitivelor fixate pe măști faciale, utilizate pentru captarea și colectarea micro-organismelor țintă oferă posibilitatea realizării unui număr mare de teste în timp scurt și la preț redus, cu identificarea celor cu capacitate de transmitere a infecției și totodată, colectarea în siguranță a măștilor utilizate contribuind la o mai bună gestionare a impactului ecologic și economic aferent utilizării pe scală largă a acestora.

Se prezintă în continuare două posibile exemple de aplicare a acestei metode (care nu limitează domeniul ei de aplicare) și în legătură cu fig.1-2 care reprezintă:

Figura 1 - Schema de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a unor micro-organisme patogene utilizând particulele magnetice funcționalizate, incorporate într-un hidrogel imobilizat în plasture. Integritatea micro-organismelor, respectiv capacitatea de infectare a acestora este evaluată cantitativ prin analize optice (de exemplu intensitate, reflectivitate, sau/ și fază) sau/și electrice (de impedanță, modul sau/și fază) a agregatelor formate prin legături specifice cu particule magnetice funcționalizate, față de modele teoretice sau referințe, de exemplu prin comparare cu agregate de micro-organisme active, respectiv inactivate prin expunerea la un stimul fizic sau chimic.

Schema de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a microorganismelor patogene utilizând particulele magnetice funcționalizate cuprinde următoarele etape:

- i) Se funcționalizează particulele magnetice cu compuși specifici micro-organismului țintă.
- ii) Se imobilizează omogen particulele magnetice într-un hidrogel, cu porozitate adecvată pătrunderii micro-organismelor țintă; concentrația de particule magnetice trebuie să fie suficient de mare pentru ca micro-organismele țintă să difuzeze eficient în spațiul dintre ele și să se lege de particulele magnetice.
- iii) Se introduce hidrogelul cu particulele magnetice într-un dispozitiv de tip plasture și se izolează prin aplicarea unei folii de izolare.
- iv) Se fixează dispozitivul pe fața internă a măștii faciale (de exemplu cu o bandă dublu adezivă), în regiunea în care fluxul de aer expirat este maxim.
- v) Înainte de utilizarea măștii faciale se îndepărtează folia de izolare.
- vi) Se captează și se colectează în dispozitiv, prin legare specifică de particulele magnetice funcționalizate, micro-organismele țintă prezente în aerul expirat către mască.
- vii) Se introduce masca facială împreună cu dispozitivul într-o unitate mobilă de analiză.
- viii) În unitatea mobilă de analiză se acționează automat asupra agregatelor în scopul separării acestora de particulele magnetice nelegate (de exemplu prin aplicarea unui câmp magnetic) și pentru analiză prin măsurarea unui semnal optic sau/și electric.
- viii) Se determină concentrația de micro-organisme prin raportarea la o curbă de calibrare.
- ix) Integritatea micro-organismelor, respectiv capacitatea de infectare a acestora este evaluată cantitativ prin analize optice (de exemplu intensitate, reflectivitate, sau/ și fază) sau/și electrice (de exemplu, de impedanță, modul sau/și fază) a agregatelor formate prin legături specifice cu particule magnetice funcționalizate, față de modele teoretice sau referințe, de exemplu prin comparare cu agregate de micro-organisme active, respectiv inactivate prin expunerea la un stimul fizic sau chimic (autoreferențiere).

Figura 2 - Schema de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a unor microorganisme patogene de tipul virusurilor, utilizând atât celule receptoare, imobilizate

în plasture între două rețele de electrozi, prin intermediul unui hidrogel adaptat păstrării viabilității celulare, precum și particule magnetice funcționalizate. Celulele receptoare prezintă în membrană receptori specifici virusului respectiv, de exemplu în cazul SARS-CoV-2, Calu 3, celulele epiteliale model care prezintă metalopeptidaza ACE II (enzima de conversie a angiotensinei 2). Celulele receptoare permit colectarea particulelor virale prezente în aerul respirat, și, în cazul virusurilor cu capacitate de infectare, asigură multiplicarea acestora cu afectarea totodată a celulelor implicate în acest proces. Modificarea viabilității celulelor receptoare și creșterea concentrației de virusuri sunt consecință a capacității de infectare a virusurilor prezente, și se evaluează distinct în unitatea mobilă prin metode electrice, optice sau electro-optice cu relevarea modificărilor de integritate a membranei celulare, respectiv apariția unor pori și implicit creșterea conductivității electrice. Determinarea concentrației virusurilor din hidrogel (inclusiv a celor multiplicare la nivel celular) se realizează și în acest exemplu de aplicare utilizând particulele magnetice funcționalizate prin formarea specifică de agregate conform schemei 1 de detecție.

Schema de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a microorganismelor patogene de tipul virusurilor, utilizând celule receptoare, imobilizate în plasture între două rețele de electrozi, prin intermediul unui hidrogel cuprinde următoarele etape:

- i) Se funcționalizează particulele magnetice cu compuși specifici micro-organismului țintă.
- ii) Se cultivă celule receptor, specifice micro-organismului (virusului) țintă.
- iii) Celule receptor se imobilizează omogen între rețele de electrozi dispuse într-un hidrogel adaptat păstrării viabilității celulare, cu porozitate adecvată pătrunderii micro-organismelor țintă, în regiuni distincte: unele în care pot pătrunde microorganismele, altele, distincte, care nu permit accesul microorganismelor, cu rol de referință, fără legătură (electrică sau fluidică) cu celelalte regiuni.
- iv) Se introduce hidrogelul cu celulele receptor într-un dispozitiv de tip plasture, se izolează prin aplicarea unei folii etanșe și se păstrează în condiții adecvate menținerii viabilității celulare.
- v) Se fixează dispozitivul pe fața internă a măștii faciale (de exemplu cu o bandă dublu adezivă), în regiunea în care fluxul de aer expirat este maxim.
- vi) Înainte de utilizarea măștii faciale se îndepărtează folia de izolare.
- vii) Exclusiv în regiunile permissive din dispozitiv, se captează și multiplică micro-organismele țintă prin pătrunderea acestora în celulele receptor.
- viii) În unitatea mobilă de analiză se determină capacitatea de infectare a virusurilor prin evaluarea integrității celulelor receptor relevate de măsurători electrice de impedanță (față de referințe) sau electro-optice
- ix) În unitatea mobilă de analiză se colectează virusurile țintă prin legarea specifică a acestora de particulele magnetice și formarea de agregate. Se aplică un câmp magnetic pentru manipularea agregatelor, în scopul separării de particulele magnetice nelegate și pentru analiza dimensiunii agregatelor prin măsurarea unui semnal optic sau/și electric.
- x) Se determină concentrația de virusuri prin raportarea la o curbă de calibrare.

Valoarea concentrației de micro-organisme se determină prin reportarea semnalului măsurat optic (de exemplu intensitate, reflectivitate, sau/ și fază) sau electric (de exemplu de impedanță, modul sau/și fază, curent, tensiune, frecvență sau mărimi derivate din acestea) la modele teoretice sau curbe de calibrare, realizate în prealabil și stocate în unitățile mobile.

**Revendicări:**

1. Metodă de identificare și de evaluare cantitativă a concentrației și capacității de infectare a micro-organismelor patogene, cu transmitere aerogenă **caracterizată prin aceea că** micro-organismele țintă sunt captate și colectate într-un dispozitiv.
2. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** dispozitivul este fixat pe o mască facială.
3. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** dispozitivul conține celule receptor care au exprimate în membrană receptori specifici micro-organismului țintă care permit legarea și ulterior pătrunderea și multiplicarea acestora în celula receptor.
4. Metodă conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** celule receptor se imobilizează între rețele de electrozi, în cel puțin o regiune expusă, în care pot pătrunde microorganismele.
5. Metodă conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** celule receptor se imobilizează între rețele de electrozi, în cel puțin o regiune, cu rol de referință, în care nu pot pătrunde microorganismele.
6. Metodă conform revendicării 4 **caracterizată prin aceea că** evaluarea capacității de infectare a micro-organismelor se realizează evaluând integritatea celulelor receptor prin măsurători electrice, optice sau electro-optice.
7. Metodă conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** evaluarea capacității de infectare a micro-organismelor se realizează evaluând integritatea celulelor receptor prin măsurători electrice sau, optice sau electro-optice ale regiunii expuse la micro-organisme, față de o referință.
8. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** se utilizează particule funcționalizate cu receptori sau/și compuși afini care leagă specific micro-organismul țintă și formează agregate.
9. Metodă conform revendicării 8 **caracterizată prin aceea că**, proprietățile agregatelor formate prin legături specifice între microorganismele țintă și particulele respective sunt evaluate prin metode electrice, optice sau electro-optice de intensitate, reflectivitate sau fază.
10. Metodă conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că**, concentrația micro-organismelor țintă se determină pe baza proprietăților agregatelor.
11. Metodă conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că**, capacitatea de infectare a micro-organismelor patogene țintă se determină pe baza parametrilor electrice sau/și optici agregatelor.
12. Metodă conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că**, capacitatea de infectare a micro-organismelor patogene țintă se determină pe baza evaluării parametrilor agregatelor cu aplicarea unor stimuli pentru inactivare.
13. Metodă conform revendicării 8 **caracterizată prin aceea că** se utilizează particule magnetice.
14. Metodă conform revendicării 13 **caracterizată prin aceea că** se aplică un câmp magnetic.
15. Metodă conform revendicării 14 **caracterizată prin aceea că**, câmpul magnetic este utilizat separarea agregatelor de particulele magnetice nelegate.
16. Metodă conform revendicării 14 **caracterizată prin aceea că**, câmpul magnetic este utilizat pentru manipularea agregatelor în vederea măsurării lor.

## Desene

i) Se funcționează particulele magnetice cu compuși specifici micro-organismului țintă.

ii) Se imobilizează omogen particulele magnetice într-un hidrogel, cu porozitate adecvată pătrunderii micro-organismelor țintă; concentrația de particule magnetice trebuie să fie suficient de mare pentru ca spațiul dintre ele să nu permită trecerea micro-organismelor țintă.

iii) Se introduce hidrogelul cu particulele magnetice într-un dispozitiv de tip pasture și se izolează prin aplicarea unei folii de izolare.

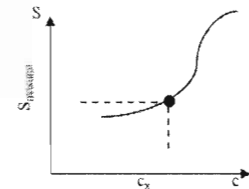
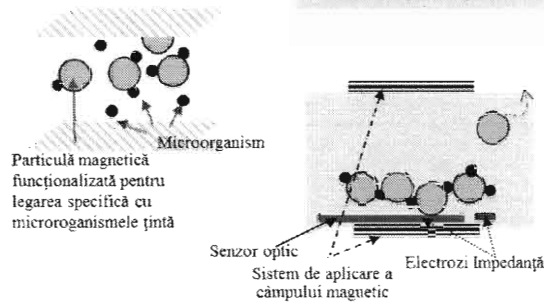
iv) Se fixează dispozitivul pe fața internă a măștii faciale (de exemplu cu o bandă dublu adezivă), în regiunea în care fluxul de aer expirat este maxim.

v) Înainte de utilizarea măștii faciale se îndepărtează folia de izolare.

vi) Se captează și colectează micro-organismele țintă în dispozitiv, prin legare specifică de particulele magnetice funcționalizate

vii) În unitatea mobilă de analiză se aplică un câmp magnetic pentru manipularea agregatelor în scopul separării acestora de particulele magnetice nelegate și pentru analiză prin măsurarea unui semnal optic sau/și electric.

viii) Se determină concentrația de micro-organisme direct sau prin raportarea la o curbă de calibrare



ix) Integritatea micro-organismelor, respectiv capacitatea lor de infectare este evaluată cantitativ prin analize optice (de exemplu intensitate, reflectivitate, sau/și fază) sau/și electrice (de impedanță, modul sau/și fază) a agregatelor formate prin legături specifice cu particule magnetice funcționalizate, față de modele teoretice sau referințe (de exemplu prin comparare cu agregate de microorganisme active, sau autoreferințe - respectiv agregatele de microorganisme inactivate prin expunerea la un stimul fizic sau chimic aplicat local).

Fig. 1 Schema metodei de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a microorganismelor patogene unor microorganisme patogene utilizând particulele magnetice funcționalizate, încorporate într-un hidrogel imobilizat în pasture.

Integritatea microorganismelor, respectiv capacitatea de infectare a acestora este evaluată cantitativ prin analize electrice, optice sau electro-optice a agregatelor formate prin legături specifice cu particule magnetice funcționalizate, față de modele teoretice sau referințe, de exemplu prin comparare cu agregate de microorganisme active, respectiv inactivate prin expunerea la un stimul fizic sau chimic

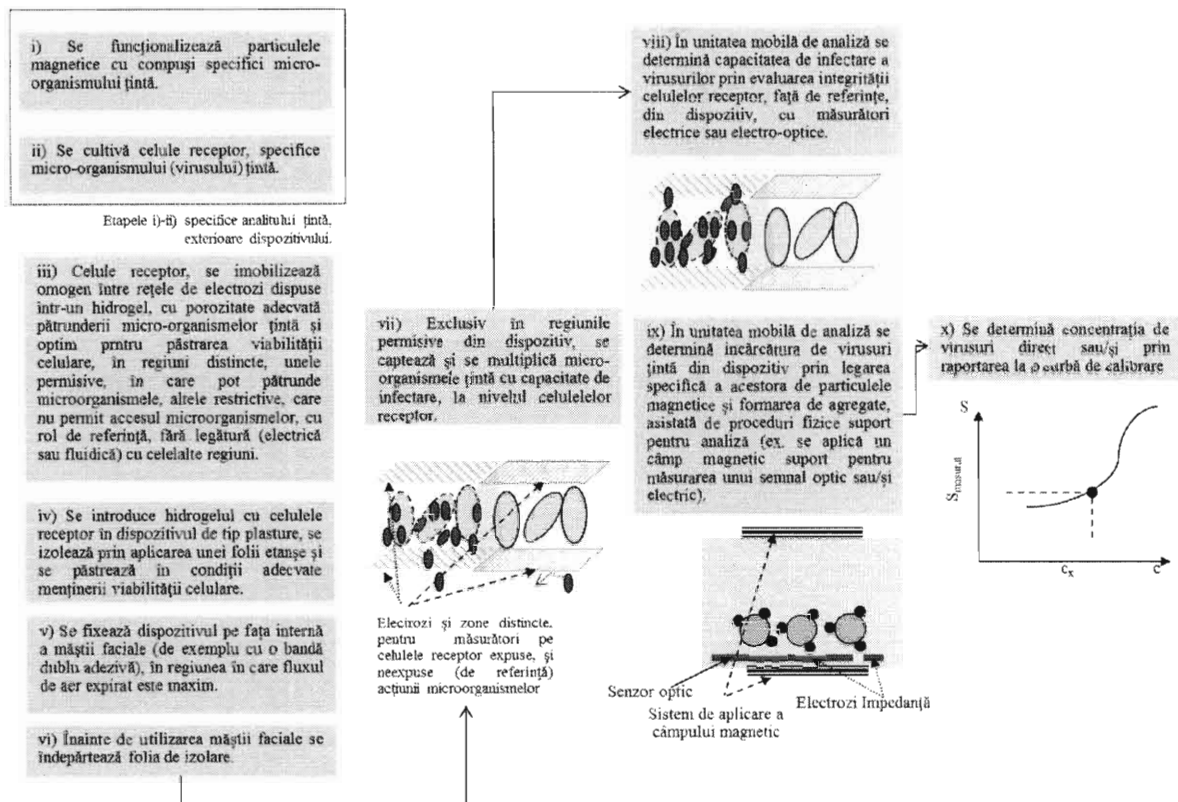


Fig. 2 Schema metodei de detecție și de determinare a concentrației și capacității de infectare a microorganismelor patogene a unor microorganisme patogene de tipul virusurilor, utilizând celule receptoare, imobilizate în pasture între două rețele de electrozi, prin intermediul unui hidrogel. Celulele receptoare permit atât colectarea, cât și în cazul virusurilor cu capacitate de infectare, multiplicarea acestora care conduce atât la creșterea concentrației de virusuri, cât și la afectarea celulelor implicate în acest proces. Modificarea viabilității celulelor receptoare este o consecință a capacității de infectare a virusurilor, se evaluează distinct în unitatea mobilă prin metode electrice, optice sau electro-optice cu relevarea modificărilor de integritate a membranei celulare, respectiv apariția unor pori și implicit creșterea conductivității electrice. Identificarea și determinarea concentrației virusurilor se realizează și în acest exemplu de aplicare utilizând particulele magnetice funcționalizate prin formarea specifică de agregate.