

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147498 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **0949/78**

(22) Indleveringsdag: **02 mar 1978**

(24) Løbedag: **17 aug 1973**

(41) Alm. tilgængelig: **02 mar 1978**

(44) Fremlagt: **03 sep 1984**

(86) International ansøgning nr.: –

(62) Stamansøgning nr.: **4539/73**

(30) Prioritet: **18 aug 1972 US 281946**

(51) Int.Cl.³: **C 12 M 1/34**
G 01 N 1/10

(71) Ansøger: ***WARNER-LAMBERT COMPANY; Morris Plains, US.**

(72) Opfinder: **Julius *Praglin; US, David Kenneth *Longhenry; US, Alan Clarkston *Curtiss; US, James Edward *McKie Jr.; US.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard**

(54) **Beholder med kamre til opdeling af en opløsning**

DK 147498 B

Opfindelsen angår en beholder af den i krav 1's indledning angivne art. En sådan beholder er f.eks. kendt fra USA patentskrift nr. 3.304.965.

Hospitalslaboratorierne har den opgave at bestemme det antibiotikum, over for hvilket en sygdomsbakterie fra en patient er mest følsom. I en artikel "Disc Susceptibility Testing" i "Hospital Practice" fra februar 1970, bind 5, nr. 2, s. 91 - 100, er Kirby-Bauer-fremgangsmåden beskrevet, hvor der måles en inhiberende zone omkring en skive med antibiotikum i en bakterievækst. Denne proces varer cirka én dag og indebærer et betydeligt manuelt arbejde samt

faren for at blive smittet med sygdomsbakterien. I "Applied Microbiology" fra december 1971 er der på s. 980 - 986 beskrevet et automatisk partikel-tællesystem. Ved hjælp af dette kan der opnås resultater på få timer, men apparatet er temmelig kompliceret og kostbart samt dræber bakterien, hvorved muligheden for fornyet måling er udelukket. Der har også været anvendt lysspredningsfotometre med laserstråler til måling af forandringer i den lysspredningskarakteristik, som opnås ved hjælp af en roterende detektor til bestemmelse af bakteriens modtagelighed over for forskellige antibiotika. Sådanne systemer og apparater er baseret på ændringer i cellernes størrelse og ikke på vækstinhiberingen (ud fra hvilken der kan drages en gyldig konklusion med hensyn til bakteriens modtagelighed). Endvidere er disse apparater relativt kostbare og skal betjenes af højt uddannet personale.

Den fra det ovennævnte patentskrift kendte teknik omfatter en beholder med som prøverum lignende kamre. Det kendte apparat har endvidere en særskilt tromle, som passer roterbart ind i en cylinder for beholderen og således tjener som en roterbar ventilspindel for overføring af opløsningen fra påfyldningsrum i tromlen til prøverummene. Ved det kendte apparat indføres opløsningen først manuelt i tromlens åbne ende, som derefter skal forsegles ved hjælp af et dæksel. Midler til indføring af reaktanter er ikke nærmere beskrevet men forekommer komplicerede og tidskrævende.

Formålet med opfindelsen er at angive en relativ simpel og økonomisk opdelt beholder, som er egnet til antibiotisk følsomhedsprøvelse, som ikke alene er baseret på accepterede og verificerede principper, men hvor beholderen ifølge opfindelsen også medfører et hurtigt, effektivt og økonomisk apparat, som er enkel i virkemåde.

Dette opnås ved, at beholderen er udformet som angivet i krav 1's kendetegnende del.

I forhold til det kendte apparat opnås en hurtigere og sikrere indføring af prøven og af reaktanten i prøverummene.

Den opdelte beholder ifølge opfindelsen er navnlig anvendelig som en del af et apparat til udøvelse af en fremgangsmåde ved bestemmelse af forskellige antibiotikas relative indvirkning på bakterier, således som det er beskrevet i dansk patent nr. (ansøgning nr. 4539/73).

Krav 2 angiver foretrukne enkeltheder ved kamrenes facon, således at overføring af opløsningen lettes mest muligt. Krav 3 medfører en særlig hurtig afgivelse af opløsningen. Ved hjælp af de i krav 4 og 5 angivne foranstaltninger opnås en effektiv åbning og lukning af de rørformede fingre. Krav 6 angiver foretrukne enkeltheder ved de rørformede fingre, idet alle disse er forbundet til en enkelt topvæg således, at deres spidser netop strækker sig under overfladen af opløsningen i prøverummene. Krav 7 medfører, at beholderen kan sprøjtestøbes i blot to sektioner.

Opfindelsen vil blive nærmere forklaret ved den følgende beskrivelse af en udførelsesform, idet der henvises til tegningen, hvor

fig. 1 viser et delvist skematisk diagram af et apparat til måling af antibiotikums indvirkning og omfattende en cuvette ifølge opfindelsen,

fig. 2 den i fig. 1 viste cuvette, set fra oven,

fig. 3 et sidebillede af den i fig. 2 viste cuvette,

fig. 4 den i fig. 2 og 3 viste cuvette, set fra bunden,

fig. 5 et bagsidebillede af den i fig. 3 og 4 viste cuvette,

fig. 6 den i fig. 2 og 3 viste cuvette, set fra venstre,

fig. 7 den i fig. 2 og 3 viste cuvette, set fra højre,

fig. 8 et tværsnit langs linien 8-8 i fig. 3,

fig. 9 - 13 successivt forløbet af påfyldning af den i fig. 2 - 8 viste cuvette fra et forsyningsrør.

Som vist i fig. 1 omfatter systemet apparater til bestemmelse af et antal forskellige antibiotikas (f.eks. tolv) indvirkning på en bakteries vækst: En éngangsplastikcuvette 12, i hvilken prøverne tilvirkes, en skivefordeler 14 til indføring af skiver 16 i cuvetten 12, en inkubations-vibrator 30 og en automatisk lysspredningsfotometeranalysator 62, som er indrettet til at bedømme bakterievæksten, og som udlæser resultaterne på en fortrykt strimmel 22

Inden brugen af den senere beskrevne beholder til opdeling af bakteriesuspensionen foretages en klinisk rendyrkning af bakterien, som overføres på en Petri-skål 20, der står natten over. Fra pladen tager bakteriologen ved hjælp af en spatel 24 adskillige kolonier af ensartet form, hvilke kolonier suspenderes ved omrøring i en saltopløsning i reagensglasset 13. Under anvendelse af fotometrets instrument kan der opnås en standardkoncentration for suspensionen i et testrør, hvilken koncentration kontrolleres i analyseapparatet 62 ved indsættelse af prøven i en åbning bag dækslet 74 og fremvises ved hjælp af instrumentet 68. Der tilsættes 2 ml af den ovenfor nævnte suspension til 18 ml vækstblanding i et testrør 78 med skrue-top. Testrøret 78 kan skrues på plastikcuvetten 12, og ved en simpel manipulation overføres testrørets indhold ligeligt til tretten cuvette-prøverum S_c og S_{1-12} . Ved hjælp af fordeleren 14 tilsættes nu eluerings-skiver som holdes suspenderet i vækstblandingen 28 i tolv adskilte rum 17 tilhørende kamrene S_{1-12} ved hjælp af plastikfingre 29 på cuvettens top. Det trettende kammer S_c er referencekammeret. Cuvetten 12 henstår derefter i 3 timer i en inkuberingsvibrator 30, som kan rumme op til tredive cuvetter. Efter 3 timers forløb ind-

sættes en cuvette 12 i analyseinstrumentet 62, og bakterievæksten i hvert af kamrene S_c og S_{1-12} måles. Ved at sammenligne med referencekammeret S_c beregnes de enkelte antibiotikas relative indvirkning i kamrene S_{1-12} .

Cuvetten 12

Måling af antibiotikas indvirkning på mikroorganismers vækst i en vækstblanding forudsætter, at den podede vækstblanding (inoculet) er indeholdt i et kammer eller en celle. Måling af væksten ved hjælp af fremadrettet spredt lys forudsætter, at et sådant kammer både er gennemskinneligt for det spredte lys og er geometrisk foreneligt med lysspredningsfotometret. Der opnås en bekvem og hurtig undersøgelse af mange antibiotikas indvirkning på en given mikroorganismes vækst ved at anvende en lige række af sådanne optiske kamre, der hænger sammen med en enhed. Cuvetten 12 tillader også en hensigtsmæssig indføring af lige store mængder podet vækstblanding til hvert af kamrene S . Cuvetten 12 er også indrettet til på hensigtsmæssig måde at kunne modtage papirskiver, der er imprægneret med antibiotika, i alle prøvekamrene, bortset fra cuvetten's referencekammer, som ikke kan modtage en sådan antibiotikasskive. Endvidere er cuvetten 12 vandtæt, optisk poleret, optisk reproducerbar, billig, forholdsvis lille, kan stables og kan kasseres efter brugen.

Cuvetten 12 er vist i fig. 2 - 8. Den er sammensat af optisk klart og inaktivt plast, som for eksempel polystyren, og fremstilles ved sprøjtestøbning i to sektioner under anvendelse af optisk polerede stålforme. Efter sprøjtestøbningen samles de to dele, enten ved hjælp af lodning eller ved hjælp af ultralydenergi. Ultralydsamlingen er at foretrække, fordi der derved undgås beskadigelse af de optiske overflader som følge af overskydende loddemateriale. Cuvetten 12 er samlet af et referencekammer S_c og tolv antibiotika-prøvekamre S_{1-12} , hvilke kamre er anbragt op til hinanden efter en ret linie. Det eneste andet materiale, som foruden polystyren anvendes i den viste cuvette 12, er en fleksibel polymer, som for eksempel styren-butadienpolymer, som anvendes til pakningen 32 og

et lukkeorgan 34. Pakningen 32 og organet 34 indsættes i cuvetten 12 inden den endelige samling.

Cuvetten 12 omfatter seks dele:

(1) Inoculum røråbning (P) (fig. 2 - 7)

En gevindskåren røråbning, som er indrettet til at modtage et gevindskåret rør 78, som indeholder den podede bakterievækst. Pakningen 32, som er anbragt ved bunden af gevindet, tilvejebringer en vandtæt pakning mellem cuvetten og inoculum-røret.

(2) Reservoiret (R) (fig. 2 - 7)

Optager den podede bakterievækst fra inoculum-røret ved at dreje cuvetten manuelt.

(3) Indbyrdes forbundne påfyldningsrum 15

En række påfyldningsrum 15 strækker sig i cuvettens længderetning (når der ses bort fra reservoiret). Rummene er forbundne med reservoiret ved hjælp af en hovedfordelingsåbning 31 og modtager inoculet fra reservoiret, når cuvetten manuelt drejes således, at rummene vender nedad, hvorved der til disse løber lige store mængder opløsning igennem fordelingsåbningerne 33, idet den fortrængte luft strømmer gennem ventilerne 35. Åbningerne 33's lysningsareal vokser i retning bort fra reservoiret R.

(4) Prøverum 17 (fig. 7 og 8)

Tretten særskilte lysspredende prøverum 17 tilhørende kamrene S_c , ($S_1, S_2 \dots S_{12}$) modtager lige store mængder inoculum fra de indbyrdes forbundne påfyldningsrum 15 ved manuelt at dreje cuvetten 90° omkring dennes længdeakse, således at rummene vender nedad. Når de tretten kamre S én gang er fyldt med podet bakterievækst, er disse kamre adskilt fra hinanden af skillevæggene 36. Fordelingsåbningerne 33 og luftfordelingsventilerne 35, som er anbragt

i toppen af hver skillevæg 36 et stykke over bakterievækstens niveau, er de eneste indbyrdes forbindelsesled mellem kamrene. Disse ventiler er nødvendige, for at vækstblandingen kan fordeles ligeligt i de nedadvendende påfyldningsrum 15 som ovenfor beskrevet.

(5) Rørformede holdere (29) til antibiotikaskiverne (fig. 7, 8)

Ned i hvert af de tolv prøvekamre ($S_1, S_2 \dots S_{12}$) strækker sig rørformede holdere 29. Hver holder er indrettet til gennem tolv skiveåbninger 26 i cuvetten 12's overside at modtage en papirskive 16 (6,5 mm diameter) med antibiotika. Skiven falder ned i holderen 29 og hviler mod holderens gulv 73. To åbninger, E, i skiveholderens vægge umiddelbart ved siden af skiven tillader at der kan trække antibiotika ud i den omgivende inoculum i prøverumme-
ne. Lukkeorganet 34 af fleksibelt plast har tolv nippelstykker 40 (også kaldet lukkepakninger), som vender ind i skiveåbningerne 26 til frembringelse af en vandtæt pakning af hver skiveholder. Lukkeorganet 34 optages mellem parallelle skinner 34a og sideåbninger 26 på cuvetten 12's overside.

Fyldning af cuvetten med vækst-inoculum (fig. 9 - 13)

Med en steril pipette overføres 2,0 ml saltopløsningsinoculum fra røret 13 til et 20 x 125 mm rør 78 (fladbundet, flintglas og med skruelåg), som indeholder 18,0 ml vækstblanding, som er filtreret gennem et 0,45 mikrometer filter. Der anvendes den sædvanlige mikrobiologiske fremgangsmåde til opvarmning af rørets munding, og efter inoculet er indført i røret med vækstblandingen, lukkes dette til. Dette rør 78 vendes forsigtigt flere gange for at blande indholdet, hvorefter låget skrues af, og røret i opret stilling skrues ind i cuvettens inoculumåbning P, indtil røret ligger blødt an mod pakningen 32. Det første og de efterfølgende stadier vedrørende korrekt fyldning af cuvetten med vækstinoculet er vist i fig. 9. Cuvetten 12 drejes nu roligt 180° på en sådan måde, at dens indhold fuldstændigt løber over i cuvettens reservoir R

(fig. 10-11). Cuvetten 12 anbringes med reservoir-endevæggen 112 på en niveauflade 114. I denne stilling er cuvetten's længdeakse vinkelret på niveaufladen som vist i fig. 11. Cuvetten 12 drejes derefter 90° , således at vækstinoculet løber fra reservoiret ind i de indbyrdes forbundne fordelingsrum 15 som vist i fig. 12. Denne drejning udføres lettest ved at tage fat om cuvetten 12 i den modsatte ende af reservoiret og nedsænke denne ende til niveauoverfladen, således at cuvetten's bagside 9 (hvor cuvetten har en udskæring B til fastholdelse af cuvetten i inkubations-vibratoren 30) hviler mod overfladen 114 som vist i fig. 13, hvor bagsiden 9 udgør et leje for et påfyldningsrum til understøttelse for påfyldningsrummene i en nedre stilling, hvor vækstinoculet kan fordeles inden i påfyldningsrummene. Væskestrømmen fra reservoiret er tilendebragt på 8 sekunder, hvorefter den sidste drejning af cuvetten foretages. Denne drejning består i at dreje cuvetten 90° omkring dens længdeakse til opretstående stilling (dvs. den stilling, ved hvilken cuvetten blev fyldt med antibiotikaskiverne), hvor cuvetten står på endevægskanten 116 og foden 118 under reservoiret R, hvor kanterne 116 og fødderne 118 udgør et leje for prøverummene til understøttelse for samlingen af kamre i en nedre stilling, hvor vækstinoculet kan strømme ind i prøverummene og forblive der. Det er meget vigtigt, at cuvetten forbliver vandret under denne sidste drejning, hvilket opnås ved at dreje cuvetten således, at begge ender forbliver i kontakt med niveaufladen under drejningen. En kontrol af den fyldte cuvette skulle gerne vise lige høje væskestande i alle prøverummene. Skiverne 16 i hver af de rørformede holdere 29 skal være beliggende lige under vækstoverfladen. I visse tilfælde vil skiverne 16 ikke ligge fladt i holderens bund, hvilket imidlertid ikke har nogen betydning, så længe skiverne er i kontakt med vækstblandingen.

P a t e n t k r a v :

1. Beholder med kamre til opdeling af en opløsning i et antal identiske prøver, som skal tilføres respektive reaktanter, hvor hver af disses indvirkning på opløsningen skal måles, og omfattende et antal påfyldningsrum, i hvilke opløsningen skal fordeles ensartet, og fra hvilke opløsningen overføres til respektive prøverum, samt hvor beholderen har et reservoir, som er indrettet til at modtage opløsningen, som skal opdeles, k e n d e t e g n e t ved, at hvert påfyldningsrum (15) og dets tilhørende prøverum (17) er beliggende i en langstrakt samling af prøvekamre (S_1-S_{12}) i beholderens længdeakse og er indrettet til, når beholderen står på et leje (9) for påfyldningsrummene, hvorved disse indtager en nedre stilling, at indføre opløsningen i form af en bakteriesuspension til påfyldningsrummene for ensartet fordeling af denne gennem forbindelsesåbninger (33) mellem påfyldningsrummene, og at hvert påfyldningsrum er således forbundet med dets tilhørende prøverum, at suspensionen vil strømme fra påfyldningsrummene til prøverummene, når beholderen drejes omkring længdeaksen, indtil beholderen løber an mod et leje (116, 118) for prøverummene, hvorved disse indtager en nedre stilling, samt at hvert prøvekammer har et hul (26) i en væg oven over dets prøverum for indførelse af en antibiotikumskive (116) i prøverummet, hvor hver af de nævnte kamres væg har en rørformet finger (29) for hvert kammer, hvorhos der findes åbninger (E) i de rørformede fingre, således at disses indhold kan slippe ind i prøverne i hvert af de nævnte prøvekamre.

2. Beholder ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at hvert af de nævnte kamre (S_1-S_{12}) i det væsentlige har form som et pistolhylster med en bred del og en næsedel, hvor påfyldningsrummene (15) udgør de brede dele, medens prøverummene (17) udgør næsedelene.

3. Beholder ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at de rørformede fingre (29) hver består af et i det væsentlige lukket rør med åbningerne (E) anbragte tæt ved spidsen.

4. Beholder ifølge krav 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at der findes aftagelige propper (40) anbragt i hvert af hullerne (26), som fører ind til de rørformede fingre (29).

5. Beholder ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at propperne (40) er fastgjort til en fleksibel strimmel (34) for at lette fastgørelse og aftagning.

6. Beholder ifølge ethvert af kravene 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter en topvæg i afstand fra de nævnte rum (17), at hullerne (26) er anbragt i den nævnte topvæg, og at hvert hul er dannet af en åben ende af en med topvæggen forbundet rørformet finger (29), der har en spids indført i et af de nævnte rum.

7. Beholder ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at topvæggen og de dertil forbundne rørformede fingre (29) udgør en topsektion for beholderen (12), og at kamrene (S_1 - S_{12}) og reservoiret (R) er tilvejebragt mellem topsektionen og en bundsektion, som er forseglet mod topsektionen.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3304965.

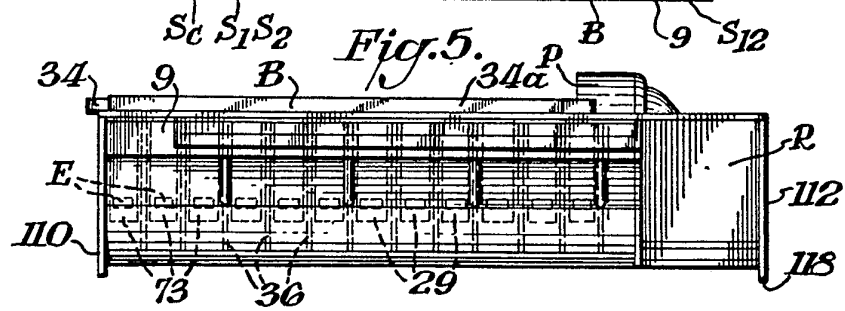
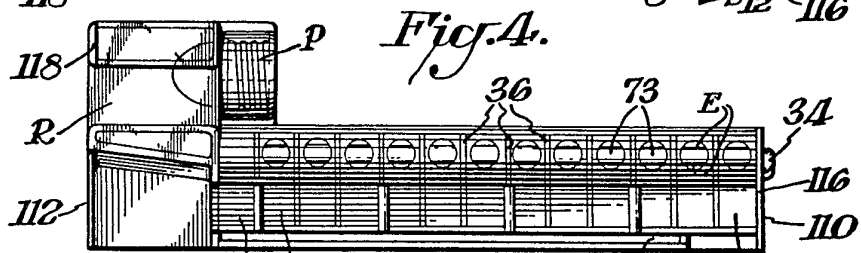
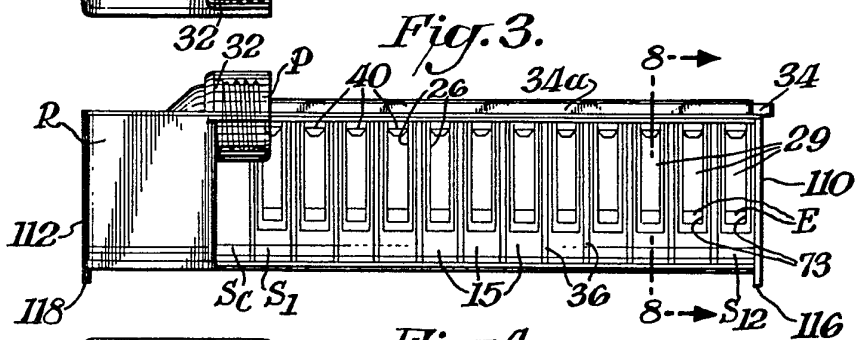


FIG. 6

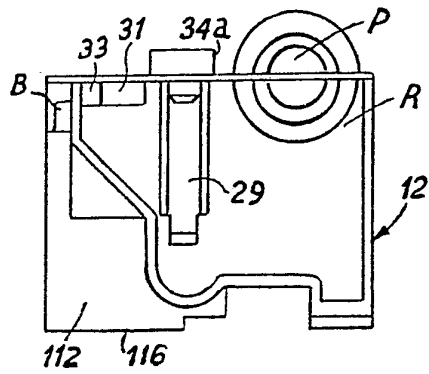


FIG. 7

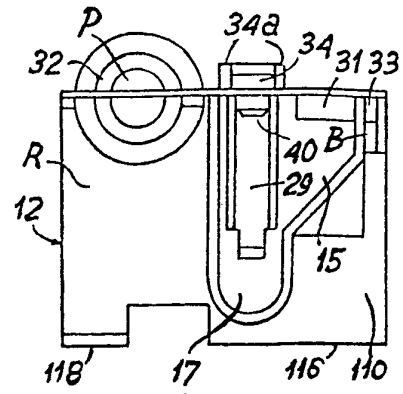


FIG. 8

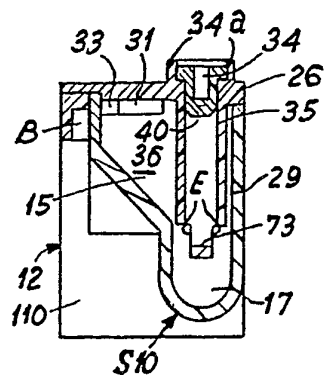
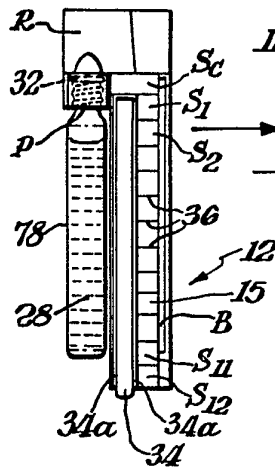
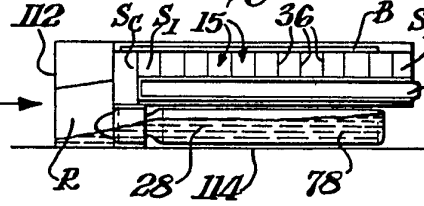
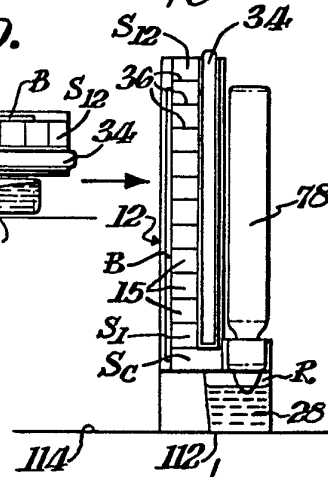
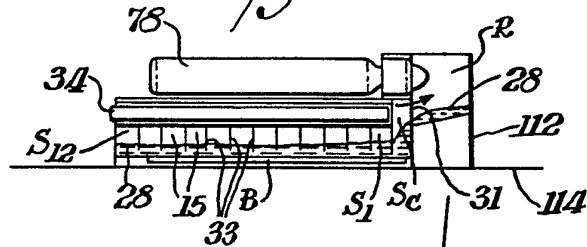


Fig. 9.*Fig. 10.**Fig. 11.**Fig. 12.**Fig. 13.*