

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 492 984

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 20140

(54) Installation automatique d'essais immunologiques par voie enzymatique.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 33/58.

(22) Date de dépôt..... 27 octobre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 28 octobre 1980, demande de brevet, n° 150152/1980, au nom
de la demanderesse.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 17 du 30-4-1982.

(71) Déposant : Société dite : FUJIZOKI PHARMACEUTICAL CO. LTD., résidant au Japon.

(72) Invention de : Tadashi Kutsusawa, Hideo Shirane, Mikiharu Fujihara et Hideho Hisada.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Flechner,
63, av. des Champs-Elysées, 75008 Paris.

La présente invention est relative à une installation automatique d'essais immunologiques par voie enzymatique apte à effectuer automatiquement un essai immunologique par voie enzymatique et, plus particulièrement, à une installation pour mesurer la quantité d'antigènes, d'haptènes ou d'anticorps se trouvant dans du sérum.

L'essai immunologique par voie enzymatique est un essai destiné à mesurer la quantité d'un antigène, d'un haptène ou d'un anticorps contenu dans du sérum en utilisant une réaction antigène-anticorps à l'aide d'une enzyme. Afin de donner une explication plus spécifique d'un essai immunologique par voie enzymatique, on va maintenant expliquer un exemple d'essai immunologique par voie enzymatique, dénommé procédé sandwich.

Dans le procédé sandwich, on fait se déposer une quantité déterminée à l'avance d'un anticorps sur un support, par exemple sur la surface d'une perle en matière plastique, et on le rend insoluble en le transformant en une phase solide, fixée à la surface du support.

A la perle portant l'anticorps, on ajoute une quantité déterminée à l'avance d'une solution test contenant un antigène dont on doit mesurer la quantité (dénommé ci-après antigène test). L'antigène se combine à l'anticorps solidifié par la réaction antigène-anticorps. On enlève ensuite la solution test et on nettoie la perle. On ajoute à celle-ci une quantité déterminée à l'avance d'une solution de réaction contenant une quantité déterminée à l'avance d'un anticorps marqué par un enzyme, par exemple un anticorps marqué par une peroxydase. Il s'effectue à nouveau une réaction antigène-anticorps entre l'anticorps marqué par l'enzyme et l'antigène qui s'est combiné à l'anticorps solidifié et déposé sur la perle. On élimine l'anticorps marqué par un enzyme qui ne s'est pas combiné à l'antigène et on mesure l'activité de l'anticorps marqué par un enzyme qui s'est combiné à l'antigène, ce qui donne une mesure de la quantité de l'antigène-test.

Dans ce cas, quand on mesure l'activité en peroxydase de l'anticorps marqué par un enzyme, qui s'est combiné à l'antigène solidifié, on emploie de l'eau oxygénée et de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), par exemple comme substrat pour l'enzyme. On lave la perle et on élimine de

celle-ci l'anticorps en excès inaltéré marqué par une peroxydase. On immerge ensuite la perle dans la solution de substrat enzymatique et cette solution de substrat enzymatique est colorée par l'enzyme. On détermine l'absorbance de la solution de substrat enzymatique à 450 nm au spectrophoromètre.

Dans le même temps, on prépare des solutions témoins contenant chacune une quantité connue de l'antigène et on mesure l'absorbance de chaque solution témoin en suivant les stades décrits ci-dessus. On obtient ainsi une courbe d'étalonnage en portant l'absorbance en fonction de la quantité d'antigène contenue dans chaque solution. Cette courbe d'étalonnage représente la relation entre la concentration d'antigène dans chaque solution et l'absorbance de la solution. En utilisant cette courbe d'étalonnage, on peut déterminer la quantité de 15 l'antigène contenue dans la solution test.

Habituellement, chaque stade de l'essai immunologique par voie enzymatique est effectué manuellement et c'est pourquoi il nécessite beaucoup de temps et les résultats obtenus par l'essai immunologique enzymatique effectué par voie manuelle 20 ne sont pas toujours précis.

L'invention vise une installation automatique d'essai immunologique par voie enzymatique apte à effectuer automatiquement un essai immunologique par voie enzymatique.

L'invention a donc pour objet une installation automatique d'essais immunologiques par voie enzymatique, apte à effectuer un essai immunologique par voie enzymatique d'une manière automatique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des moyens pour déplacer, suivant une direction longitudinale, un porte-tubes portant des tubes à essais, ce porte-tubes étant placé dans un cageot ;
- des moyens pour déplacer le porte-tubes suivant une direction transversale ;
- des moyens pour insérer une buse d'aspiration et une buse d'injection d'un liquide de nettoyage, dans n'importe lequel des tubes à essais, ou dans plusieurs de ces tubes à essais, afin d'y injecter du liquide de refroidissement après enlèvement du liquide contenu dans ce tube à essais par aspiration et rejet de ce liquide ;
- des moyens pour insérer une buse d'injection d'un

liquide de réaction dans le tube à essais et pour injecter un liquide de réaction dans ce tube à essais ;

- des moyens pour appliquer des vibrations à ce tube à essais ;

5 - des moyens pour insérer une buse d'attraction dans le tube à essais et pour en tirer une perle qui y a été mise au préalable en attirant cette perle et en la faisant tomber dans un second tube à essais ;

10 - des moyens pour insérer une buse d'injection d'un substrat et une buse d'injection d'un liquide mettant fin à la réaction et pour injecter ce liquide mettant fin à la réaction dans le second tube à essais après y avoir injecté un substrat ;

15 - des moyens pour insérer une buse de mesure dans le second tube à essais et pour transporter le liquide de ce tube à essais à un appareil de mesure ;

- un spectrophotomètre destiné à mesurer l'absorbance du liquide ; et

- une imprimante pour enregistrer la valeur de l'absorbance qui a été mesurée.

20 Grâce à cette installation, on peut effectuer plus rapidement et plus précisément et d'une manière automatique un essai immunologique par voie enzymatique, qui était effectué jusqu'ici manuellement.

Aux dessins annexés, donnés uniquement à titre d'exemple :

25 la figure 1 est une vue en perspective de la partie principale d'un mode de réalisation de l'installation automatique d'essai immunologique par voie enzymatique suivant l'invention ;

30 la figure 2 est une vue en perspective différente de la portion principale de l'installation automatique d'essai immunologique par voie enzymatique représentée à la figure 1.

35 Comme le montrent les figures 1 et 2, des tubes 1 et 1' à essais sont placés respectivement dans des porte-tubes 2 et 2', dix tubes à essais étant placés dans chaque porte-tube. Les porte-tubes 2 et 2' sont placés respectivement dans des cageots 3 et 3' à raison de 22 porte-tubes par cageot. Les tubes 1 et 1' à essais servent chacun de chambre pour la réaction antigène-anticorps.

Dans chacun des tubes 1 à essais est placée une perle

en matière plastique (non représentée) qui porte une quantité déterminée à l'avance d'un anticorps solidifié et une quantité déterminée à l'avance d'un liquide-test (non représenté) contenant un antigène à mesurer, de sorte qu'une réaction antigène-anticorps peut s'effectuer dans chaque tube à essai.

5 Les cageots 3 et 3' peuvent être enlevés de l'installation automatique d'essai immunologique par voie enzymatique.

Il est prévu des mécanismes 4 et 4' destinés à entraîner les porte-tubes 2 le long des cageots 3 longitudinalement suivant la direction des X et des mécanismes 5 et 5' destinés à entraîner les porte-tubes 2 transversalement suivant la direction des Y, les tubes à essais portés par le porte-tubes 2 pouvant être déplacés individuellement.

10 Lorsque l'un des tubes 1 à essai arrive à une position prescrite et y est arrêté, une buse 6 d'aspiration et une buse 15 7 d'injection d'un liquide de nettoyage sont insérées dans ce tube 1 à essai. Après achèvement de la réaction antigène-anticorps dans le tube 1 à essai, on jette la solution-test dans une bouteille 8 par l'intermédiaire de la buse 6 d'aspiration.

20 A l'aide d'un dispositif 9 d'injection, on injecte du liquide de nettoyage dans le tube 1 à essai par la buse 7 d'injection de liquide de nettoyage de manière à laver la perle (non représentée) dans le tube 1 à essai. On évacue ensuite le liquide de nettoyage dans la buse 6 d'aspiration et on le rejette en 25 l'envoyant à la bouteille 8.

Les mouvements verticaux de la buse 6 d'aspiration et de la buse 7 d'injection de liquide de nettoyage sont effectués par un mécanisme 10 élévateur.

30 Après que le tube 1 à essai a été déplacé, du liquide de réaction est injecté dans le tube 1 à essai par l'intermédiaire d'une buse 12 d'injection de liquide de réaction, grâce à un dispositif 11 d'injection de liquide de réaction. Le tube 1 à essai est supporté par un mécanisme 13 et des vibrations 35 lui sont appliquées par un organe 14 vibrant de manière à ce que la perle contenue dans le tube 1 à essai soit mise en "bon contact d'agitation" avec le liquide de réaction. Une buse 15 d'attraction est ensuite insérée dans le tube 1 à essai afin de déplacer la perle vers le haut par l'effet d'aspiration de la buse 15. La perle est déplacée suivant la direction des Y tout

en étant attirée vers la buse 15 et on la fait ensuite tomber dans l'un des tubes 1' à essai portés par le porte-tubes 2'.

Un substrat est injecté dans le tube 1' à essai par un dispositif 16 d'injection de substrat et par une buse 17 d'injection de substrat et on laisse la perle réagir sur le substrat. On injecte ensuite un liquide de fin de réaction dans le tube 1' à essai par un dispositif 18 d'injection d'un liquide de fin de réaction et par une buse 19 d'injection d'un liquide de fin de réaction. On applique alors des vibrations au tube 1' à essai par un organe 14' vibrant, de manière à bien mélanger le contenu du tube 1' à essai.

Une buse 20 de mesure est insérée dans le tube 1' à essai à l'aide d'un vérin 21 pneumatique de manière à envoyer le liquide du tube 1' à essai à un appareil 22 de mesure dans lequel l'absorbance du liquide est mesurée par un spectrophotomètre incorporé à l'appareil 22 de mesure. La valeur mesurée est enregistrée par une imprimante 23. Toutes les opérations décrites ci-dessus sont effectuées par un microordinateur 24.

Suivant l'invention, la quantité de l'antigène contenue dans la solution-test peut être détectée automatiquement et le résultat détecté peut être enregistré aussi automatiquement conformément au stade opératoire décrit ci-dessus.

Des exemples préférés d'un dispositif de déplacement du porte-tubes 2, d'un mécanisme destiné à faire vibrer les organes 14 et 14' et d'un mécanisme pour faire fonctionner la buse 15 d'attraction et la buse 20 de mesure dans l'installation automatique d'essai immunologique par voie enzymatique sont décrits ci-dessous.

Le porte-tubes 2 est placé dans le cageot 3. Plusieurs poulies sont disposées le long des quatre côtés du cageot. Un câble passe sur ces poulies et est entraîné par un moteur. Une portion d'entraînement destinée à déplacer le porte-tube est fixée au câble. Un mécanisme à levier mobile est disposé sur la portion d'entraînement. La portion supérieure du levier mobile est insérée dans un trou ménagé dans le fond du porte-tubes 2, le levier du mécanisme étant déplacé lorsque le câble est entraîné en rotation et le porte-tubes 2 se déplace aussi.

Les organes 14 et 14' destinés à engendrer des vibrations

sont reliés à un aimant permanent (par exemple un aimant en ferrite de baryum) par l'intermédiaire d'une plaque. On fait vibrer l'aimant permanent sous l'action d'un dispositif engendrant un champ magnétique en courant alternatif, ce dispositif étant disposé au voisinage de l'aimant permanent. Les vibrations engendrées sont transmises au tube à essai par la plaque intermédiaire et par les organes de vibration, de sorte que le contenu du tube à essais est mélangé.

La buse 15 d'attraction est insérée dans le tube à essai dans lequel est placée une perle. L'extrémité de la buse 15 d'attraction est mise en contact avec la perle. En raison de la dépression dans la buse, la perle est attirée vers l'extrême supérieure de la buse et est ensuite enlevée du tube à essai. La buse, alors que la perle se trouve attirée au sommet de celle-ci, est insérée dans un autre tube à essai et on ramène la pression de la buse à la pression atmosphérique, de sorte que la perle tombe dans le tube à essai.

Il vaut mieux que la buse 20 de mesure soit maintenue inclinée par rapport au tube à essai après qu'elle a été retirée du tube à essai, afin d'éviter que d'autres liquides ne viennent s'attacher à la buse 20 de mesure. A cette fin, un support de la buse 20 est fixé au piston du vérin pneumatique de sorte que le support tourne sous l'effet du déplacement linéaire du piston, si bien que la buse est maintenue verticalement ou avec une certaine inclinaison (de 45° environ) par rapport au tube à essai.

REVENDICATION

Installation automatique d'essais immunologiques par voie enzymatique, apte à effectuer un essai immunologique par voie enzymatique d'une manière automatique, caractérisée en ce 5 qu'elle comprend :

- des moyens (4) pour déplacer, suivant une direction longitudinale, un porte-tubes (2) portant des tubes (1) à essais, ce porte-tubes (2) étant placé dans un cageot (3) ;
- des moyens (5) pour déplacer le porte-tubes 10 (2) suivant une direction transversale ;
 - des moyens (10) pour insérer une buse (6) d'aspiration et une buse (7) d'injection d'un liquide de nettoyage, dans n'importe lequel des tubes (1) à essais, ou dans plusieurs de ces tubes (1) à essais, afin d'y injecter du liquide de refroi-15 dissement après enlèvement du liquide contenu dans ce tube à essais par aspiration et rejet de ce liquide ;
 - des moyens (11) pour insérer une buse (12) d'injection d'un liquide de réaction dans le tube à essais et pour injecter un liquide de réaction dans ce tube à essais ;
- des moyens (14) pour appliquer des vibrations à ce 20 tube à essais ;
 - des moyens pour insérer une buse (15) d'attraction dans le tube à essais et pour en tirer une perle qui y a été mise au préalable en attirant cette perle et en la faisant tomber 25 dans un second tube (1') à essais ;
 - des moyens pour insérer une buse (17) d'injection d'un substrat et une buse (19) d'injection d'un liquide mettant fin à la réaction et pour injecter ce liquide mettant fin à la réaction dans le second tube à essais après y avoir injecté un 30 substrat ;
 - des moyens pour insérer une buse (20) de mesure dans le second tube à essais et pour transporter le liquide de ce tube à essais à un appareil (22) de mesure ;
 - un spectrophotomètre destiné à mesurer l'absorbance 35 du liquide ; et
 - une imprimante (23) pour enregistrer la valeur de l'absorbance qui a été mesurée.

FIG. 1

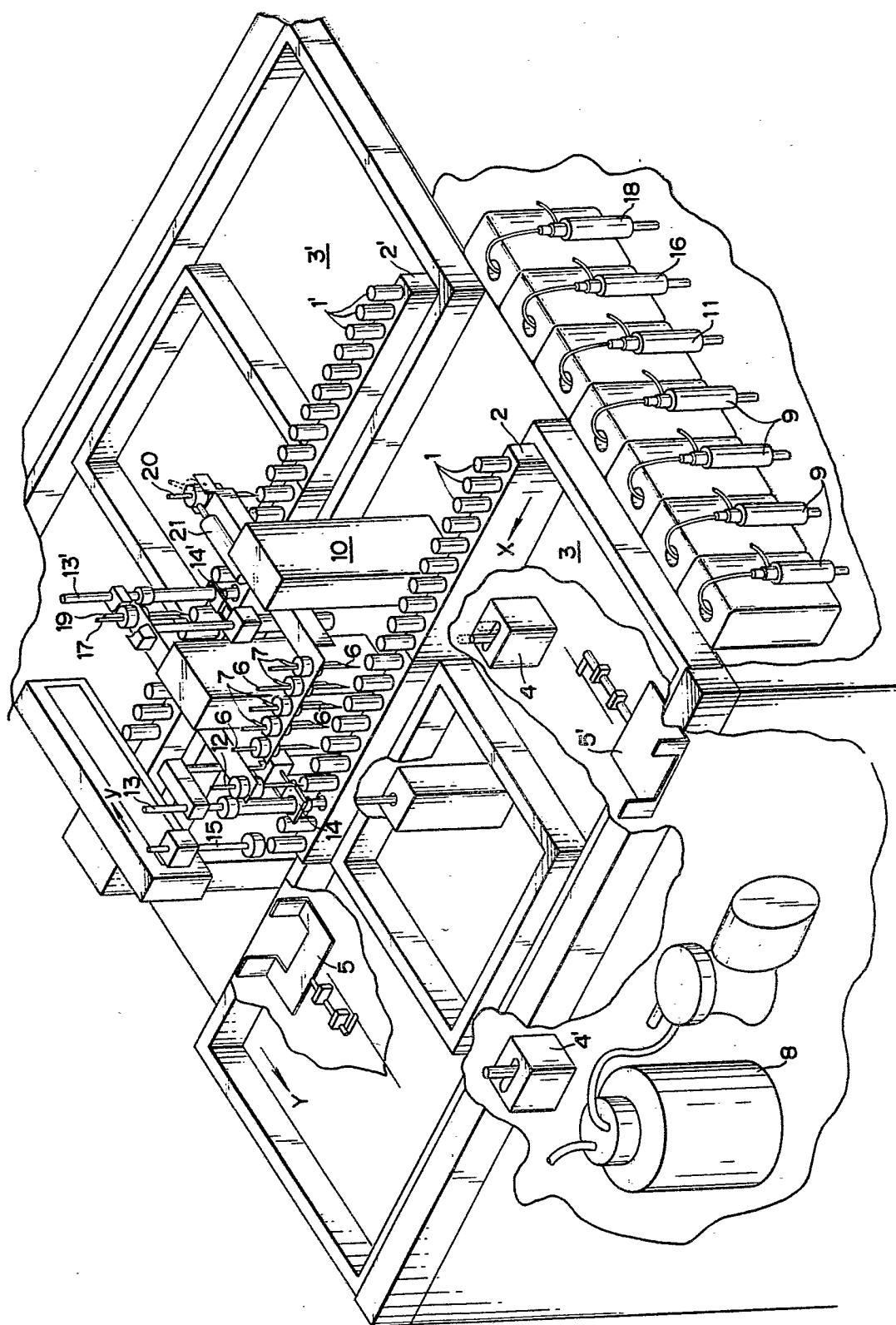


FIG. 2

