

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 13688

(54)

Procédé et photomètre à éclair pour la réalisation de déterminations néphélométriques.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 21/51; G 01 J 3/40; G 01 N 21/64, 21/84.

(22)

Date de dépôt..... 10 juillet 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : RFA, 10 juillet 1980, n° P 30 26 089.0.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 2 du 15-1-1982.

(71)

Déposant : NOELLER Hans Guenter, résidant aux EUA.

(72)

Invention de : Hans Guenter Noeller.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, avenue de la Grande-Armée, 75017 Paris.

La présente invention concerne d'une manière générale des appareils d'analyse chimique et plus particulièrement des dispositifs néphélométriques et fluorimétriques.

5 Au cours de la dernière décade, on a développé un grand nombre de dispositifs très onéreux qui sont efficaces dans le domaine de l'analyse turbidimétrique, néphélométrique et fluorimétrique et pour le transfert automatique des données de ces valeurs d'analyse sur
10 un papier d'enregistrement. Bon nombre de ces dispositifs remplissent les tâches hautement spécialisées qui leur sont affectées, dans le domaine de la recherche et dans des installations médicales de taille assez importante. Cependant, la majeure partie des tâches de routine dans
15 le domaine de la médecine ne peut pas être effectuée de manière économique à l'aide de ces dispositifs. Par exemple, le petit laboratoire médical ou le laboratoire du cabinet du médecin n'a pas les moyens de disposer de ces appareils d'analyse automatisés extrêmement onéreux.
20 Ainsi, le médecin ne dispose actuellement d'aucun dispositif auxiliaire entièrement satisfaisant pour réaliser la détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

La disponibilité de nombreux et nouveaux différents antibiotiques et la nécessité de déterminer le
25 meilleur antibiotique approprié pour combattre une souche bactérienne particulière isolée d'un patient ont incité à exiger un procédé hautement sensible, simple et par conséquent bon marché, tout en étant extrêmement fiable, de détermination de la sensibilité aux antibiotiques,
30 fournissant des résultats en quelques heures après l'acquisition de l'échantillon en vue des essais.

Une caractéristique principale de la présente invention est d'indiquer un procédé simple et par conséquent pas très compliqué de détermination de données
35 néphélométriques et fluorimétriques. Le procédé utilise une impulsion ou un éclair de lumière fourni par un flash électronique, c'est-à-dire une lumière stroboscopique comme source de lumière. Ce procédé est extrêmement sensible

et est particulièrement approprié pour la détermination rapide de la sensibilité des germes à des antibiotiques particuliers, en un très bref intervalle de temps et sans un effort ni une dépense importants. C'est pourquoi la présente invention fournit le résultat des essais au bout d'un bref intervalle de temps d'exécution des essais sur un échantillon. En outre, le résultat de l'essai est présent sous la forme d'un document photographique qui peut être lu visuellement ou bien par voie photométrique et peut être mémorisé en vue de permettre de s'y référer ultérieurement. De façon typique, le document photographique est une image sur papier, c'est-à-dire une mince pellicule photographique sur un substrat en papier, comme par exemple un tirage photographique "Polaroid".

Selon l'une de ses caractéristiques, le procédé selon l'invention consiste à enregistrer un rayonnement néphélométrique et fluorimétrique provenant de plusieurs échantillons situés dans des conteneurs qui possèdent une géométrie essentiellement identique. Plusieurs de ces échantillons sont disposés de manière à recevoir des quantités sensiblement identiques avec des intensités sensiblement identiques d'un rayonnement d'activation arrivant selon une première direction en provenance d'une source de lumière. Une pellicule photosensible, qui peut être une pellicule transparente formant elle-même son propre support ou bien une pellicule de matière photosensible placée sur un substrat, comme par exemple un tirage photographique à développement automatique, par exemple un tirage "Polaroid", est disposée de manière à recevoir une lumière émise à partir des échantillons suivant une seconde direction, qui est essentiellement perpendiculaire à la première direction suivant laquelle le rayonnement d'activation tombe sur l'échantillon. La source de lumière est activée de manière à déclencher, par la source d'échantillonnage stroboscopique, l'émission d'une impulsion de brève durée, mais d'intensité élevée suivant la première direction en direction des

échantillons. Pendant l'impulsion, la pellicule est exposée à la lumière rayonnée à partir de tous les échantillons. La lumière produit des degrés différents d'exposition sur la pellicule photographique, ce qui produit des densités optiques différentes lorsque la pellicule est développée. La densité optique de la pellicule photosensible développée est proportionnelle à l'intensité de la lumière rayonnée par les échantillons respectifs. La lumière rayonnée est fournie naturellement par la lumière d'activation. La lumière rayonnée peut être un rayonnement fluorimétrique, dans lequel la lumière d'activation active par voie photochimique un composant de l'échantillon, ou bien il peut s'agir d'une lumière réfléchie comme dans le cas des déterminations néphélométriques et turbidimétriques classiques.

Le procédé tel que décrit peut être appliqué en particulier à la classification des antibiotiques pour déterminer l'efficacité d'antibiotiques respectifs vis-à-vis de bactéries, du point de vue de l'inhibition de la croissance de ces dernières dans un milieu. Dans cette application, une série d'échantillons, dans chacun desquels est introduit un échantillon de la bactérie et qui contiennent des antibiotiques respectifs, plus des échantillons supplémentaires de contrôle de ce type comme cela peut être souhaité, sont préparés dans des conteneurs de même géométrie. De façon typique, ces conteneurs pourraient être des flacons de même taille et de même forme. On fait incuber les échantillons pendant un intervalle de temps prédéterminé. On peut faire incuber tous les échantillons pendant le même intervalle de temps ou bien pendant des intervalles de temps différents. Puis on place les échantillons suivant une disposition prédéterminée les uns par rapport aux autres, on les soumet au rayonnement d'activation et on enregistre le rayonnement sur la pellicule, comme cela a été décrit ci-dessus. En correspondance avec les échantillons respectifs, le médecin ou le praticien du laboratoire médical peut aisément déterminer la puissance d'inhibition relative de

chaque antibiotique vis-à-vis de la bactérie en question.

La présente invention concerne également un appareil particulier pour la mise en oeuvre du procédé indiqué ci-dessus. L'appareil se compose d'un porte-
5 échantillons qui est construit et disposé de manière à soutenir plusieurs conteneurs d'échantillons possédant une géométrie uniforme. La source de lumière, qui est caractérisée par le fait que, lors de son activation, elle émet une impulsion de lumière de brève durée et de haute
10 intensité, est construite et agencée de manière à diriger un faisceau de lumière d'activation impulsionnelle depuis la source dans une première direction vers les échantillons. Il est prévu des dispositifs directifs qui sont constitués et conformés de manière à provoquer l'exposition
15 de tous les échantillons essentiellement à la même quantité et à la même intensité de lumière d'activation, lorsque la source est commandée de façon impulsionnelle. Le dispositif d'enregistrement photographique comporte certains moyens pour positionner une pellicule photographique dans une disposition prédéterminée par rapport
20 aux échantillons de telle sorte que, lorsque l'appareil est en cours d'utilisation et que la source de lumière est commandée de façon impulsionnelle, l'impulsion de lumière d'activation tombe sur tous les échantillons
25 suivant la première direction et tous les échantillons irradient une lumière en une quantité plus ou moins importante en fonction de leur composition, à partir de ladite lumière d'activation, suivant une seconde direction avec exposition simultanée de la pellicule à la lumière
30 irradiée par les échantillons situés dans leurs conteneurs respectifs, qui sont montés sur le support. Le dispositif d'enregistrement est construit et agencé de manière que la seconde direction soit sensiblement perpendiculaire à la première direction.

35 A titre d'exemple on a décrit ci-dessous et illustré schématiquement aux dessins annexés un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention ; sur ces dessins :

40 la figure 1 est une représentation schématique de l'appareil de la présente invention ;

la figure 2 est une représentation schématique d'une pellicule photosensible, comme par exemple un tirage photographique sur lequel la pellicule est portée par un substrat plat, par exemple un tirage "Polaroid",
5 montrant la densité optique de tirage des échantillons respectifs au moyen d'un nombre plus ou moins important de lignes selon différentes configurations de manière à fournir une indication de la densité optique plus ou moins grande.

10 On va décrire ci-après un exemple d'une forme de réalisation simple, testée et éprouvée, du dispositif et du mode d'exécution du procédé pour la mise en oeuvre des essais conformément à la présente invention, et en se référant aux dessins annexés. Il s'agit là d'une forme
15 de réalisation donnée à titre d'exemple, qui toutefois n'est pas limitative.

Une source de lumière 1, comme par exemple une lampe-éclair électronique ou une lumière stroboscopique, par exemple un dispositif photographique à flash
20 ou à éclair au xénon, est disposée de telle manière que la lumière d'activation traverse un filtre monochromatique 2. Lorsque l'on utilise l'appareil pour des déterminations fluorimétriques, la longueur d'onde de transmission du filtre tel que par exemple un filtre interférentiel, correspond à la longueur d'onde d'excitation
25 de la substance devant être testée. La lumière d'activation monochromatique est envoyée à travers l'extrémité cylindrique d'un dispositif 3 de surface étendue, qui projette le faisceau de lumière monochromatique impulsionnelle sur une série de conteneurs d'échantillons,
30 possédant une géométrie uniforme, comme par exemple des tubes à essai en verre à fond plat 4, dont l'axe longitudinal est perpendiculaire à la première direction d'incidence de la lumière d'activation. Cette lumière d'activation, qui tombe sur les conteneurs des échantillons et
35 traverse l'échantillon, est focalisée ou collimatée à une distance d'environ 10 mm au-dessus du fond des tubes à essai en verre, perpendiculairement à l'axe de ces

tubes à essai, qui sont les conteneurs des échantillons.

Les conteneurs des échantillons, à savoir les tubes à essai en verre, sont placés debout sur un plateau transparent 5. Ce dernier peut être constitué en verre ou en une matière plastique transparente. Le plateau est noirci hormis au niveau des surfaces 6 où les conteneurs des échantillons, c'est-à-dire les tubes à essai à fond plat, sont respectivement disposés. Ainsi, cette plaque joue simultanément le rôle de la face avant d'un dispositif d'enregistrement protographique, comme par exemple un appareil photographique "Polaroid" 9. L'objectif 7 de l'appareil de prise de vues est situé au-dessous de la face avant de cet appareil de prise de vues de même que l'obturateur et un support coulissant pour un filtre de lumière 8. Lorsque l'on utilise le dispositif pour des déterminations fluorimétriques, on dispose un filtre d'émission dans le support coulissant. Le filtre d'émission correspond à la longueur d'onde d'émission de la substance devant être testée. L'objectif de l'appareil de prise de vues est monté sur le plateau plat mentionné précédemment de manière à être mis au point à une distance d'environ 10 mm au-dessus du niveau du plateau 5.

Lorsqu'on utilise le dispositif pour des déterminations fluorimétriques, on introduit les filtres requis d'excitation et d'émission dans l'appareil et l'on place les échantillons dans les conteneurs installés les uns à côté des autres.

Simultanément, lors de l'actionnement unique ou multiple de la source de lumière, on actionne l'obturateur de manière à obtenir le déclenchement unique ou multiple d'un éclair. La lumière est rayonnée à partir des échantillons dans une seconde direction qui est essentiellement perpendiculaire à la direction de la lumière d'activation incidente et la pellicule est exposée simultanément à la lumière irradiée par tous les échantillons. Ultérieurement, on peut retirer l'image, qui est obtenue à l'aide de techniques photographiques classiques ou bien à l'aide de techniques de développement de photographie à grande

vitesse, comme par exemple dans l'appareil photographique "Polaroid" à développement instantané. On peut optimiser la densité au moyen d'un réglage du diaphragme.

Sur la pellicule photographique, on obtient
5 des zones circulaires en forme de disques possédant une densité ou un assombrissement variable. Le degré de densité optique dépend directement de la concentration de la substance fluorescente dans l'échantillon. La densité optique peut être évaluée de façon subjective au moyen
10 d'une simple observation visuelle ou bien peut être déterminée de façon plus précise à l'aide de dispositifs classiques de mesure de la densité optique ou de la lumière réfléchie.

Lorsqu'on utilise le présent dispositif pour la
15 détermination de données néphélométriques, la seule opération nécessaire consiste à insérer un filtre de lumière unique en vue de réaliser une monochromatisation et par conséquent en vue de satisfaire à la loi de Beer.

EXEMPLE

20 La procédure suivante a donné de bons résultats lors de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques, au cours d'un certain nombre d'essais.

On remplit les tubes à essai en verre cylindriques à fond plat, stérilisés, possédant un diamètre intérieur légèrement supérieur à 0,635 cm, avec une solution
25 nutritive, par exemple une solution de 1 millilitre de "Trypticase" standard ou avec une autre solution nutritive standard. On introduit dans la solution un échantillon d'un microlitre d'une culture liquide saturée pure ou
30 mixte d'une substance contenant des bactéries, tirée d'un patient.

Dans cette application, on ajoute un antibiotique différent dans chacun des tubes qui sont remplis jusqu'à un niveau uniforme, hormis un tube qui sert de tube de
35 contrôle. Ceci s'effectue de façon très simple, par exemple en ajoutant un disque antibiotique, c'est-à-dire une petite feuille de papier buvard d'un diamètre d'environ 0,635 cm, que l'on a traitée avec une quantité standard

d'antibiotique. Actuellement, on dispose dans le commerce d'une gamme étendue de disques antibiotiques possédant des sensibilités différentes.

Etant donné que cette méthode est extrêmement
5 sensible, on utilise des disques possédant un très faible contenu de substance efficace. Par exemple, des disques chargés de 0,5 microgramme de tétracycline se sont avérés efficaces.

On soumet les échantillons à une incubation
10 pendant un intervalle de temps prédéterminé de par exemple 120 min ou de 90 min et à une température désirée, de façon typique voisine de 37°C. On retire les disques antibiotiques de chacun des tubes et on place les tubes sur les surfaces de contact 6 de la plaque 5 de l'appareil, comme cela a été décrit précédemment. En utilisant
15 un appareil de prise de vues "Polaroid" 9 comme dispositif d'enregistrement photographique, et après actionnement de la source de lumière en vue de produire un éclair et de réaliser un éclairage approprié de la pellicule
20 photographique, on obtient par exemple le développement de la photographie instantanée ou d'une autre image. On peut disposer de résultats presque instantanés en utilisant la technique de tirage photographique à développement instantané, par exemple avec un appareil de prise de vues
25 "Polaroid".

En utilisant les différents antibiotiques, on obtient une série de disques noircis, c'est-à-dire une série de disques possédant des densités optiques différentes. L'antibiotique, qui fournit le degré le plus
30 élevé de densité optique dans l'image positive, est l'antibiotique le plus approprié. Le degré le plus faible de densité optique est associé au tube de contrôle. Dans ce tube, la croissance bactérienne n'a pas été influencée, ni limitée pendant la période d'incubation et les bactéries
35 se sont multipliées à une cadence très élevée, comme cela est déterminé par la diffusion accrue de lumière, et a fourni l'effet néphélométrique reproductible le plus intense. Ceci peut être déterminé par un examen visuel

subjectif, ou bien il est possible de déterminer objectivement la densité optique des différentes zones individuelles en utilisant des dispositifs photographiques classiques. Ces différences de densité optique sont illustrées schématiquement sur la figure 2. Cette figure
5 montre une pellicule photographique, par exemple un tirage d'appareil "Polaroid" dans lequel la pellicule est située sur un substrat en papier, et montre dix zones en forme de disques possédant des densités optiques ou des
10 assombrissements différenciables. Neuf de ces zones, c'est-à-dire les zones 12 à 20, ont été obtenues en testant des échantillons contenant différents antibiotiques. La zone 11, à savoir la zone en forme de disque possédant la densité optique ou le noircissement le plus faible,
15 est l'échantillon de contrôle. Le degré le plus élevé de densité optique est présent dans la zone 18, qui correspond à l'échantillon contenant la tétracycline. Parmi les échantillons, dans lesquels on a introduit des doses comparables d'antibiotiques, la tétracycline a
20 fourni l'effet le plus intense. De la discussion précédente et de la description du procédé et de l'appareil selon la présente invention, il ressort que le présent procédé de détermination néphélométrique et fluorimétrique, utilisant une lampe-éclair en tant que source de lumière,
25 fournit un degré extrêmement élevé de luminosité et de sensibilité et rend possible l'obtention d'une sensibilité très élevée lorsque l'on utilise le dispositif pour des déterminations fluorimétriques ainsi que pour des déterminations néphélométriques, en dépit du fait que l'appareil et les dispositifs d'essai auxiliaires sont relative-
30 ment bon marché. Un autre avantage du procédé est qu'il fournit des documents objectifs sous la forme de photographies qui peuvent être évaluées subjectivement d'une manière simple et sans effort ou bien qui peuvent être
35 évaluées de façon objective à tout moment sans aucune difficulté en utilisant un dispositif photométrique de mesure de la densité optique.

Etant donné que le procédé est basé sur l'intensité extrêmement élevée de l'impulsion de lumière, ce procédé conforme à la présente invention est extrêmement approprié pour la détermination de la sensibilité des bactéries à différents antibiotiques, et par conséquent est extrêmement approprié pour réaliser la sélection de l'antibiotique le plus approprié pour un patient donné en vue de combattre une souche ou une infection bactérienne. Cependant, la présente invention n'est pas limitée à cette application particulière. La détermination néphélo-

5 bactéries à différents antibiotiques, et par conséquent est extrêmement approprié pour réaliser la sélection de l'antibiotique le plus approprié pour un patient donné en vue de combattre une souche ou une infection bactérienne. Cependant, la présente invention n'est pas limitée à

10 cette application particulière. La détermination néphélo-

métrique d'une croissance bactérienne même minimale en utilisant le procédé décrit présentement permet de sélectionner l'antibiotique le plus approprié d'une manière beaucoup plus rapide que cela n'était possible en utilisant

15 les procédés jusqu'alors disponibles.

Compte tenu de ces avantages, on comprendra que la présente invention n'est pas limitée à la technique, au procédé ou aux structures spécifiques décrits ci-dessus, qui sont donnés uniquement à titre d'exemple.

20 Un domaine d'application industrielle de la présente invention est notamment le domaine de la médecine clinique.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour effectuer l'enregistrement néphélométrique ou fluorimétrique d'un rayonnement émanant de plusieurs échantillons situés dans des conteneurs

5 (4) possédant une géométrie sensiblement identique, caractérisé en ce qu'il se compose des phases opératoires suivantes consistant :

- à disposer plusieurs échantillons de manière qu'ils reçoivent un rayonnement d'activation d'un in-
10 tensité sensiblement identique suivant une première direction, en provenance d'une source de lumières (1),

- à disposer une pellicule photosensible de manière qu'elle reçoive simultanément la lumière irra-
diée par lesdits échantillons et qui est dirigée depuis
15 ces derniers suivant une seconde direction sensiblement perpendiculaire à la première direction,

- à actionner la source de lumière (1) de ma-
nière qu'elle émette une impulsion de brève durée de lu-
mière très intense suivant la première direction vers les
20 échantillons,

- à exposer la pellicule pendant la durée de cette impulsion à la lumière rayonnée par tous les échan-
tillons, et

- à comparer la densité optique de la pellicule
25 photosensible développée, en tant que mesure de l'inten-
sité de la lumière rayonnée produite dans les échantillons respectifs à partir de la lumière d'activation.

2. Procédé permettant de classer les antibio-
tiques de manière à déterminer leur efficacité contre
30 des bactéries, selon lequel on teste l'action d'inhibition exercée par les antibiotiques sur la croissance des bactéries en question,, caractérisé en ce qu'il comporte les phases opératoires suivantes consistant :

- à préparer des séries d'échantillons dans des
35 conteneurs (6) de même géométrie, contenant les bactéries en question et, dans les échantillons respectifs, diffé-
rents antibiotiques,

- à laisser incuber les échantillons pendant des

intervalles de temps prédéterminés,

- à placer les conteneurs (6) pour échantillons dans une disposition prédéterminée les uns par rapport aux autres de manière que tous les échantillons reçoivent un rayonnement d'activation d'une intensité sensiblement identique suivant une première direction à partir d'une source de lumière (1),

- à disposer une pellicule photographique de manière qu'elle reçoive la lumière irradiée à partir de tous les échantillons suivant une seconde direction sensiblement perpendiculaire à la première direction,

- à activer la source de lumière (1) pour qu'elle émette une impulsion de brève durée de rayonnement d'activation dans ladite première direction vers les échantillons,

- à exposer simultanément la pellicule à la lumière rayonnée suivant ladite seconde direction à partir des échantillons, et

- à comparer la densité optique des parties de la pellicule développée, qui correspondent aux échantillons respectifs, sous la forme d'une indication de l'inhibition exercée par les antibiotiques respectifs sur lesdites bactéries.

3. Appareil permettant d'effectuer des déterminations néphélométriques et fluorimétriques selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comporte:

- un porte-échantillon (5) construit et agencé de manière à supporter plusieurs conteneurs (6) de géométrie uniforme pour échantillons,

- une source de lumière (1) qui, lorsqu'elle est actionnée, émet une impulsion de lumière de brève durée et de haute intensité,

- des moyens (2, 3) pour diriger un faisceau de la lumière impulsionnelle d'activation depuis la source suivant une première direction vers les échantillons, lesdits moyens étant constitués et conformés de manière à provoquer une exposition de tous les échantillons à sensiblement la même quantité et la même intensité de

la lumière d'activation, lorsque la source est commandée de façon impulsionnelle, et

- un dispositif d'enregistrement photographique (7, 9) comportant des moyens pour positionner une pellicule photographique dans une relation prédéterminée par rapport aux échantillons de telle manière que, lorsque l'appareil est utilisé et que la source de lumière (1) est commandée de façon impulsionnelle, l'impulsion de lumière d'activation rencontre tous les échantillons suivant la première direction et que les échantillons irradient la lumière produite à partir de la lumière d'activation, suivant une seconde direction sensiblement perpendiculaire à la première direction de manière à réaliser une activation simultanée de la pellicule à la lumière irradiée provenant des conteneurs (6) des échantillons, situés dans le porte-échantillons (5).

