

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningsskrift nr. 124603

Int. Cl. C 12 k 1/10 kl. 30h-14

Patentsøknad nr. 1832/69	Inngitt	3.5.1969
Løpedag	-	
Søknaden alment tilgjengelig fra		4.11.1970
Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt		8.5.1972
Prioritet begjært fra:	-	

Rolf Saxholm,
Box 3, 1362 Billingstad.

Oppfinner: Søkeren.

Fullmektig: Siv.ing. Per Onsager.

Fremgangsmåte ved utførelse av diffusjonsprøver i mikrobiologisk, immunologisk og lignende laboratoriearbeide, og virkestoffbærende legeme for utførelse av fremgangsmåten.

Oppfinnelsen vedrører en ny teknikk som muliggjør en rasjonalisering og automatisering av mikrobiologisk, immunologisk og lignende laboratoriearbeide. Den baserer seg på en prøveteknikk med diffusjon av virkestoffer i faste eller halvfaste substrater (medier) hvor utfallet av prøvene i form av reaksjoner resp. vekstforandringer kan observeres på optisk vei. Den omfatter tester som er biologiske (d.v.s. mikrobiologiske, immunologiske, serologiske og andre biokjemiske tester, som klinisk kjemiske tester) eller kjemiske forsåvidt de egners seg for en diffusjonsteknikk.

Mikrobiologiske og immunologiske diffusjonstester blir ofte utført ved at virkestoffet i tilmålte doser, gjerne inneholdt i virkestoffbærere som papirskiver, tabletter eller lignende, deponeres

124603

2

på eller i et fast eller halvfast substrat. Ved mikrobiologiske tester reagerer virkestoffet med en kultur av mikroorganismen inokulert på eller i substratet eller med forskjellige stoffer i substratet produsert av mikroorganismekulturen, mens virkestoffet ved immunologiske tester reagerer med forskjellige stoffer tilført substratet eller produsert av mikroorganismekulturen.

Virkestoffet diffunderer ned i og ut i det faste substrat og reagerer med de nevnte kulturer eller stoffer under forandring i vekst resp. reaksjon. Dette kan registreres på grunnlag av forskjellige biologiske, kjemiske eller fysikalsk-kjemiske fenomener. En vanlig test av dette slag er bestemmelse av bakteriers sensitivitet overfor antibiotika, hvor man måler utstrekningen av sirkulære hemningssoner i bakterieveksten rundt posisjonene av påførte virkestoffer.

Virkestoffbæreren, som regel en lapp eller tablett, absorberer vandig substrat eller medium. Da dermed diffusible stoffer fra substratet diffunderer inn i lappen eller tabletten, lar det seg også gjøre å gjennomføre visse egnede reaksjoner i selve bærelegemet.

Det faste eller halvfaste substrat er mikroporøst og har et høyt vanninnhold for at diffusjonsmekanismen skal kunne realiseres. Substratet kan være tørt til å begynne med og få tilført vann. Det kan være en gel av f.eks. stivelse, gelatin, silica eller være laget på cellulosebasis. Den mest alminnelige gel er en agar gel som kan ha betydelig mekanisk styrke selv ved meget høyt vanninnhold. Agar er kjemisk meget inert og gir en gel velskikket for diffusjonstesting. Ved mikrobiologiske tester må substratet inneholde næringsstoffer, og det må være sterilt før det inokuleres. Substratet er plasert i en beholder eller på et underlag, som i tilfelle av mikrobiologisk testing vanligvis er en petriskål eller såkalt "large plate", mens substrat og underlag i tilfelle av immunologisk testing også kan være en såkalt "coated plate".

Diffusjonsteknikken med mikroporøse og faste substrater som reaksjonsmiljø har mange fordeler fremfor anvendelsen av flytende substrater, som i regelen krever langt mer tungvint og omstendelig håndtering, og hvor mulige innflytelser av feilkilder, spesielt forurensninger, ofte er vanskelige å identifisere, så der kreves stor omhu ved utførelsen og også regelmessig kontroll for å muliggjøre entydige slutninger. På faste substrater blir f.eks. forurensende mikrober lette å iaktta, idet de forblir som isolerte kolonier på overflaten. I flytende substrater gjennomtrenger veksten hele substratvolumet.

Blakningen - som registreres - av det flytende substrat vet man ikke om skyldes de mikrober som undersøkes, eller vekst av en forurensende mikrobe. Dette krever ekstra kontrollarbeide.

Ved sensitivitetsundersøkelser vil forholdet mellom den resistente og den sensitive del av bakteriepopulasjonene kunne iakttas ved faste substrater, men ikke ved flytende.

På den annen side er diffusjonsteknikken med faste substrater i hittil kjent form beheftet med mangler som begrenser dens anvendelse. Således skyldes en prinsipiell begrensning at diffusjonen av virkestoffet fra de enkelte bærelegemer fører til en tidsavhengig konsentrasjonsgradient utover fra bærelegemet, noe som i forbindelse med at virkningen er en funksjon av både konsentrasjon og tid (f.eks. når det gjelder det stadium i en bakteriekulturs utvikling da en hemning setter inn) gir en betydelig usikkerhet i bedømmelsen av hva som foregår. For å gjøre det mulig å tilmåle egnede doser for bærelegemene og bedømme virkningen på grunnlag av visuell observasjon, f.eks. for bestemmelse av minste veksthemmende konsentrasjon, er det derfor nødvendig på forhånd å utføre møysommelige forsøk med kjente konsentrasjoner som referanse, idet f.eks. en bedømmelse av virkningen av et virkestoff i et menneskelig legeme forutsetter et arbeide med bestemte kjente konsentrasjoner.

Ved plasering av flere virkestoffer på samme substrat er der også fare for at virkestoffer fra nærliggende legemer kan interferere og gi synergistiske eller antagonistiske virkninger som man ikke er herre over.

Det er riktignok kjent å søke å unngå interferenser ved å dele opp et substrat med skillevegger utformet på bunnen f.eks. av en petriskål eller ved bruk av mer eller mindre oppdelte eller forgrenede substrater med virkestoffer pålagt de enkelte grener. Men dermed innfører man til gjengjeld en effekt som det nettopp er viktig å unngå, nemlig den såkalte rekyleffekt ("rebound effect") som forårsaker ukontrollerbare konsentrasjonsfordelinger med derav følgende usikkerhet i bestemmelsen av sensitivitetssonene, og man gir også avkall på de fordeler de tradisjonelle petriskåler eller "large plates" gir når det gjelder å kunne stryke ut en utsæd jevnt på substratoverflaten.

For å kunne arbeide med kjente konstante konsentrasjoner i faste substrater må man idag gå frem på den måte at virkestoffet innblandes i det flytende substrat før stivningen. D.v.s. der benyttes ikke en diffusjonsteknikk, men en fortynningsteknikk, hvor der for

4
124603

hver konsentrasjon av hvert virkestoff, resp. av hver virkestoff-kombinasjon, kreves en særskilt petriskål eller lignende. Dette gjøres idag i stor utstrekning for referanseforsøk, særlig i industrien, men ville falle altfor vidløftig f.eks. ved titreringsforsøk i kliniske laboratorier.

De nevnte mangler og de dermed forbundne begrensninger ved kjente fremgangsmåter hvor man arbeider med faste substrater, blir ved hjelp av oppfinnelsen ryddet av veien, hvorved der åpnes nye muligheter for en rasjonell utnyttelse av denne teknikk. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er i første rekke karakterisert ved at man anvender bærelagemer som er utformet med en i vertikalretning hovedsakelig rettlinjet, diffusjonstett vegg som har underkanten hovedsakelig forløpende i et plan og er formet for i det minste delvis å inngrense et areal på sin ene side, og driver bærelagemene til bunns i substratet, hvortil virkestoffet avgis på den nevnte side ved at bærelaget på forhånd bærer virkestoffet på denne side eller har kanaler eller porer hvor igjennom virkestoffet ledes inn, hvorved virkningen i substratet blir begrenset til et av veggen helt eller delvis omsluttet observerbart område.

Man får dermed mulighet for i ett og samme substrat etter inokulasjonen rett og slett ved selve pålegningen av virkestoffbærerne å avgrense passende små reaksjonsområder hvor der - hvis disse ifølge oppfinnelsen helt omsluttet av bærelagemene - i løpet av relativt kort tid etablerer seg en diffusjonslikevekt med en jevn, kjent konsentrasjon av virkestoff og eventuelle i substratet inneholdte komponenter, samtidig som farge- og andre endringer i områdene lettvis kan observeres, f.eks. visuelt og/eller fotometrisk, særlig spektrofotometrisk. Der åpnes derved en mulighet for å utføre automatiske analyser - gjerne i stor målestokk - som man tidligere bare har hatt ved arbeide med væsker, også ved arbeide med faste substrater og dermed blant annet i mikrobiologisk arbeide.

I den variant hvor områdene ikke er helt omsluttet, kan fremgangsmåten gjøre det mulig å oppnå interferensvirkninger under regulerbare betingelser, f.eks. for å bedømme om det ene og det annet stoff samvirker synergistisk eller antagonistisk, og i tilfelle hvorledes, eller ikke interfererer.

Hva angår de virkestoffbærende legemer som anvendes ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, vil det forstås at de skal ha en diffusjonstett vegg som har underkanten i det minste tilnærmedesvis liggende i et plan og helt eller delvis omslutter et nedentil åpent rom, noe som i og for seg ikke er nytt. For å kunne fylle sin oppgave

i det foreliggende tilfelle er bære-legemene ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at en til det nevnte rom grensende flate av legemet er forsynt med et belegg inneholdende virkestoffet eller er utformet med fine kanaler eller porer egnet til å avgi deri inneholdt eller gjennomledet virkestoff til substratet i dette rom.

Hva som kan oppnås ved bruk av oppfinnelsen, såvel som ytterligere trekk ved fremgangsmåten og bærelegemene vil i det følgende bli belyst nærmere i forbindelse med bestemte anvendelser og på bakgrunn av den kjente teknikk på de respektive felter.

Som et viktig eksempel kan nevnes bakterienes spaltning eller forgjæring av forskjellige sukkerarter. Denne spaltning vurdert for serien av sukkerartene, er gjerne karakteristisk for den enkelte bakterietype og avviker ofte for bakteriene innbyrdes. Forholdet har en vid anvendelse som hjelpemiddel til å skille bakterier fra hverandre. Hvis en bakterie spalter en sukkerart til syreprodukter, så senkes pH-verdien i substratet, hvilket kan iakttas ved omslag av farven av den tilsatte indikator.

Hvis der eksempelvis til et fast substrat er satt en sukkerart som forgjæringsgrunnlag og bromthymolblått som indikator, vil en utsæd av sukkerspaltende og ikke-sukkerspaltende bakterier manifestere seg på følgende måte: De sukkerspaltende bakterier vokser under dannelse av gule kolonier på overflaten av substratet, mens de ikke-sukkerspaltende danner blå kolonier av samme farve som substratet hadde før utsæden. Gule og blå kolonier kan ligge tett ved siden av hverandre på substrat-overflaten.

Et tilsvarende flytende substrat vil forandre farve til gult hvis sukkerspaltende bakterier vokser i det, men forbli blått hvis der er vekst utelukkende av ikke-spaltende bakterier.

Når der som et ledd i en klassifikasjon er spørsmål om bestemmelse av en bakteries forgjæringsforhold overfor forskjellige sukkerarter, brukes gjerne flytende substrater.

Da oppfinnelsen tar sikte på blant annet å rasjonalisere forgjæringsforsøk, skal der gis en nærmere beskrivelse av hvordan et forgjæringsforsøk utføres etter kjent metode.

Den bakterie som skal bestemmes ved forgjæringsforsøk, må rendyrkes. Fra denne renkultur gjøres så utsæd til buljonger som finnes opptappet på reagensrør. Buljongene inneholder indikator og forskjellige sukkerarter. Disse rør er lukket med dott, propp eller kapsel. Reagensrørene med buljongene hensettes i stativer og inkuberes for vekst og

124603

reaksjon. Utfallet avleses ved inspeksjon av hvert rør, og det noteres manuelt.

Metoden krever manuell hensetning av rørene i stativer. Hvert buljongrør inneholder bare én sukkerart, men antallet av sukkerarter kan ofte være forholdsvis stort. Derfor blir det relativt brysomt å håndtere og skille rørene med sukkerartene når de skal ordnes i rekke i stativene. Mulighet for forveksling og feil foreligger.

Inokulasjonsprosessen er også relativt besværlig. Hvert rør med sukkerartbuljong inokuleres, idet proppen tas av; røret flamberes i øvre kant for å fjerne eventuelle mikrobielle forurensninger, hvorefter proppen igjen settes på plass.

Rørene, som vanligvis er av glass, må etter avlesningen gjennomgå en tids- og arbeidskrevende prosess med sikte på å brukes om igjen. Først blir de autoklavert for å drepe kulturene. De blir så tømt, vasket og skyllet, hvorefter de blir forsynt med propp. Deretter steriliseres de, og de er så ferdige for ny opptapning av buljonger inneholdende sukkerarter og indikator.

Tids- og arbeidskrevende er også prepareringen av de substrater som blir tappet i rørene. Først skal buljongen lages, hvorefter der til porsjoner av denne skal settes en rekke forskjellige sukkerarter. Disse opptappes på rør og blir sterilisert på behørig måte. Rørene merkes for tilkjenngivelse av sukkerart. De hensettes i kjøleskap i påvente av bruk.

Rørene er plasskrevende på grunn av sin relativt betydelige størrelse og sitt store antall. Virkningen av dette merkes under arbeide i laboratoriet, oppbevaring i kjøleskap og inkubator, lagerhold og transport. I tillegg kreves lagerhold og renhold av stativer.

Ifølge oppfinnelsen kan det ovenfor omtalte forgjæringsforsøk utføres ved at preproduserte, f.eks. rørformede bærelegemer forsynt med forskjellige sukkerarter drives til bunns i et i og for seg kjent fast substrat i skål. Indikatoren kan hensiktsmessig tilsettes bærelegemene, eller også kan den på kjent vis allerede være tilført substratet.

Før innsetningen av bærelegemene er skålens substratoverflate i sin helhet jevnt inokulert med en oppslemning eller flytende kultur av den rendyrkede bakterie.

Etter at legemene er tilført substratet, vil sukkeret - og indikatoren hvis den er tilsatt legemene - diffundere ut i substratet. Det foregår i de vanlig anvendte substrater så raskt at man ikke ville

få noen vellykket reaksjon hvis sukkeret ble applisert via en papirskive som det er oppsuget i, eller via et tablettlegeme som sukkeret er innblandet i.

Ved at det appliserte legeme i henhold til oppfinnelsen avgrenser et perifert lukket kammer, vil den sukkerart som diffunderer ut, forbli i dette kammer og utjevne seg med en jevnt fordelt konsentrasjon. Denne sluttkonsentrasjon er da avhengig av det substratvolum som er avgrenset, og av massen av den sukkerart som er applisert.

Bærelegemene som presses ned i det faste substrat slik at de med basis når bunnen av skålen, bør med sin øvre del rage noe opp over substratoverflaten. Substrattykkelsen i skålen er oftest ca. 0,5 cm eller noe mindre, og høyden av legemet bør således være litt større enn dette. Tverrmålet kan være f.eks. 0,5 - 1,5 cm. Oventil kan legemene være åpne eller forsynt med gjennomsiktig tak.

For oventil åpne bærelegemers vedkommende er det dog ikke absolutt nødvendig at de er høyere enn substratet, da de, hvis de har mindre høyde, i innsatt tilstand vil levne en spalte i substratet ved sin overkant, så det avgrensede område allikevel ikke vil ha kontakt med substratet omkring.

Legemene inneholder de sukkerarter som skal inngå i reaksjonene. Egnede konsentrasjoner og mengder av sukkerartene, f.eks. oppsuget i filterpapir eller tilblandet en formålstjenlig masse, anbringes under fabrikasjonen på hensiktsmessig måte i legemene. Anbringelsen kan gjennomføres ved at f.eks. et fórr med sukkerartene blir festet på innsiden av legemets vegger. Dette kan hvile på en nedre, indre kant eller avtrapning like ovenfor legemets basale avslutning. Alternativt kan sukkerartene anbringes i hulrom i legemets vegger. Indre veggglamell er perforert, slik at diffusjon kan finne sted inn til det rom som legemet egentlig omslutter. Veggkammeret bør være lukket i bunnen.

Foruten at bærelegemes sidevegger som omslutter reaksjonsområdene, kan brukes som bæreorgan for sukkerartene, kan der til samme formål også brukes indre installasjoner i bærelegemene. Sentralt kan der foreligge et torpedo-, prosjektil- eller stjerneformet organ eller andre hensiktsmessig formede organer. De kan være festet f.eks. ved hjelp av et bærekryss understøttet ved legemets overkant. Videre kan legemet ha skillevegger av forskjellig form og forløp, som helt eller delvis avdeler det rom legemet egentlig omslutter. Disse skillevegger, og i det hele tatt alle indre installasjoner kan på tilsvarende måte som ytterveggene være konstruert hule med perforerte

veggflater, unntatt langs underkanten.

Etterat et legeme med en sukkerart er bragt på plass i substratet, skjer diffusjonen inn i den substratmasse som er avgrenset av legemets vegger. Hos et legeme med perforert innervegg skjer diffusjonen gjennom perforeringene.

Mengden av den sukkerart som på en eller annen av de nevnte måter er anbragt i sammenheng med legemene under produksjonsprosessen, er avpasset slik at sukkerarten etter diffusjonen inn i substratmassen, som er avgrenset av legemets vegger, vil anta en konsentrasjon egnet til formålet med de forgjæringsforsøk man utfører.

Man vil ved forgjæringsforsøk oppnå gode resultater uansett hvilken geometrisk form legemets tverrsnitt har. Selv om det er tilfelle, kan det være av interesse å diskutere legemets form i relasjon til diffusjonslikevekten. Dets form og sukkerartens plaseringssted har betydning for hvor raskt sluttkonsentrasjonen av sukkerarten etableres i legemets substratmasse. Et sirkelrundt legeme med sukkerarten plasert langs veggen, omslutter en substratmasse som blir relativt sent gjennomtrengt sammenlignet med andre former, på grunn av sirkelens relativt store areal i forhold til omkretsen. En plaserings av sukkerarten i midten av det runde legeme eller/og i eller langs seksjonsvegger i tillegg til den foregående plaserings, fører til en raskere tilstand av diffusjonslikevekt. Også f.eks. et smalt, rektangulært legeme med sukkerarten plasert ved langveggene vil være gunstig for en relativt rask etablering av den endelige sukkerkonsentrasjon i det avgrensede substrat. Også ved andre reaksjoner enn forgjæringsforsøk kan valget av legemets form ha praktiske konsekvenser for reaksjonenes forløp og utfall.

En inntruffen eller "positiv" forgjæringsreaksjon viser seg ved omslag av indikatorfarve etter inkubasjon ved 37°C i egnet tid, mens ingen eller "negativ" reaksjon karakteriseres ved intet omslag av farve. Utfallene av reaksjonene er lette å avlese.

I en beholder med substrat, f.eks. en petriskål, plaseres flere legemer i egnet avstand fra hverandre. Hvert legeme inneholder én sukkerart, slik at alle legemene tilsammen representerer de ulike sukkerarter den undersøkte bakteriekultur skal prøves med forgjæringsforsøk overfor.

Det er hensiktsmessig å plasere legemene i substratet med en i og for seg kjent dispenser av tilsvarende slag som er i bruk ved plaserings av papirskiver inneholdende antibiotika. Legemene med sukkerartene oppbevares sterilt, stablet på hverandre i magasiner, slik at et

magasin inneholder legemer med samme sukkerart. I avleveringsinnretningen er der på kjent måte plass til flere magasiner ved siden av hverandre, de enkelte magasiner med innbyrdes forskjellig innhold av sukkerart-legemer.

Etter anbringelsen av legemene på den faste substratoverflate kan de manuelt eller maskinelt presses til gjennombrudd av substratet og til kontakt med bunnen av skålen ved hjelp av f.eks. et stempel eller en lignende anordning som presser alle legemer ned under ett i samme operasjon. Når legemene rager noe oppover substratoverflaten, er der ingen fare for at stempelflaten skal komme i kontakt med substratet.

Legemene kan være montert på et bæreskjelett ved hvis hjelp de i én manøver kan presses til gjennombrudd av substratet og på plass i det.

På tilsvarende måte som beskrevet i patentsøknad nr. 166.874 kan legemene gjøres magnetisk påvirkbare. Ved hjelp av magnetiske krefter trekkes de til gjennombrudd av substratet og til kontakt med bunnen av skålen. Den magnetiske kraft kan eventuelt først appliseres etterat legemene ved tyngdekraftens hjelp er landet på substratoverflaten. De magnetisk påvirkbare deler kan være anbragt f.eks. inne i legemets vegg i nedre del eller kant. Således kan dette materiale bestå av en sammenhengende jernring eller -mansjett, eller også av granulerte deler, eventuelt med de dimensjoner rørveggenes tykkelse tillater. Alternativt kan hele veggen av legemet være ferromagnetisk.

Hvis det ønskes, kan man gi nedre kant av legemet en noe eggformet eller skarp utformning, slik at substratet lettere gjennomskjæres.

Legemene kasseres etter bruk. Bortsett fra de omtalte deler av jern kan de med fordel være laget av plast eller lignende, som destrueres ved forbrenning.

Sukkerforgjæringsreaksjonene er ikke kritiske mot en ufullstendig tilslutning eller tetthet mellom bunnen av skålen og legemets underkant. Selv en grovt tilskåret nedre kant av legemet garanterer reaksjoner av like god kvalitet som en med meget god tilslutning.

Reaksjonenes identiteter kan på tilsvarende måte som beskrevet i patentsøknad nr. 1326/69 bestemmes maskinelt på grunnlag av definerte posisjoner.

Også reaksjonenes utfall er maskinlesbare funksjoner. Avlesningen kan foretas under visuell kontroll. Maskinen anvises på enkel måte om en reaksjon er positiv eller negativ, eller hvilken grad av

positivitet reaksjonene viser. I et tilfelle som det omtalte, med klare, distinkte farvereksjoner og veldefinerte kriterier for bestemmelse av en reaksjons utfall vil det også være mulig å foreta helautomatisk avlesning.

For gjennomførelse av en slik helautomatisk avlesning kan man f.eks. benytte en petriskål med gjennomsiktig bunn og gjennomlyse de inngrensede reaksjonsområder samtidig eller etter tur for å registrere de optisk observerbare endringer - farveomslag, grumsing eller lignende - eller endringsgrader på fotometrisk, eventuelt spektrofotometrisk vei, f.eks. for innmatning i datamaskin.

Der åpnes dermed muligheter for å gjennomføre automatiske analyser både på felter som ikke var praktisk tilgjengelige for en slik teknikk, og på en måte som lar seg realisere med enklere og billigere apparatur enn i tilfeller hvor man har vært henvist til å arbeide med flytende substrater.

Ved forgjæringsforsøk brukes konvensjonelt én undersøkelse for hver sukkerart. Der brukes en definert, hensiktsmessig konsentrasjon av sukkerarten. Undersøkelser foretatt av patentsøkeren tyder på at man vil kunne oppnå et mer differensiert diagnostisk uttrykk hvis flere konsentrasjoner av sukkerarten inngår i undersøkelsen. En slik metode vil være prohibitiv med de arbeidsmuligheter som teknisk sett foreligger idag. Selv med én konsentrasjon av hver sukkerart betyr forgjæringsundersøkelsene en stor belastning for laboratoriene.

Oppfinnelsen gjør det imidlertid mulig på en enkel og arbeidsbesparende måte å gjennomføre en forgjæringsundersøkelse med flere konsentrasjoner av en sukkerart. Foruten å bruke et eget legeme for hver sukkerkonsentrasjon, kan der til alle konsentrasjoner brukes et legeme med seksjonskamre til fordeling av sukkerkonsentrasjonene. Legemet kan i dette tilfelle utformes som f.eks. et relativt langt, rektangulært legeme inndelt i tverrgående, sammenhengende, rektangulære seksjoner. Hver seksjon inneholder en bestemt konsentrasjon av sukkerarten, slik at man får en suksessiv stigning eller et suksessivt fall i sukkerkonsentrasjonen fra seksjon til seksjon i det langstrakte, rektangulære legeme. Dette legeme representerer følgelig en bestemt sukkerart, dets seksjoner forskjellige konsentrasjoner av sukkerarten.

Sukkerarten er identifisert ved posisjonen av det rektangulære legeme som sådant, og den sukkerkonsentrasjon hvor en eventuell forgjæring først inntrer, er bestemt ved posisjonen av vedkommende kammer i seksjonsrekken.

Det omtalte legeme kan også anvendes med forskjellige

sukkerarter i seksjonskammene.

Oppfinnelsen er imidlertid som nevnt ovenfor, ikke bare begrenset til bruk ved forgjæringsforsøk, men ved en lang rekke mikrobiologiske og immunologiske forsøk.

Eksempelvis vil metoden kunne anvendes til sensitivitetsbestemmelser av bakterier mot antibiotika (og kjemoterapeutika).

Idag utføres slike bestemmelser vanligvis ved hjelp av "lapp"-metoden eller "sensi-disc"-metoden.

Oppfinnelsen gjør det derimot mulig på enkel vis å utføre sensitivitetsbestemmelser ved hjelp av en titreringsteknikk. Derved oppnår man en direkte kvantitativ bestemmelse f.eks. av minste veksthemmende konsentrasjon av et antibiotikum, til forskjell fra den indirekte metode med måling av sonediameterens størrelse. Metodene supplerer hverandre.

Til bruk ved en slik kvantitativ teknikk kan der preproduseres legemer inneholdende forskjellige konsentrasjoner av et antibiotikum. Dette gjøres for alle antibiotika. I et titreringsforsøk brukes for hvert antibiotikum en bestemt serie av legemene, slik at man får en stigning i konsentrasjonene av vedkommende antibiotikum fra legeme til legeme. F.eks. et legeme inndelt i seksjonskamre, som ovenfor omtalt, kan også brukes til formålet. Kamrene er da på forhånd forsynt med forskjellige konsentrasjoner av et antibiotikum i trinnvis stigning fra kammer til kammer. Man observerer minste veksthemmende konsentrasjon, forutsatt at den undersøkte bakterie er sensitiv mot vedkommende antibiotikum.

Hvis man idag vil utføre en kvantitativ sensitivitetsbestemmelse, må den utføres i en serie reagensrør med buljong eller i beholdere med fast substrat, inneholdende trinnvis stigende konsentrasjoner av et antibiotikum. På grunn av arbeidsmengden er dagens teknikk prohibitiv som generell rutinemetode.

Til tross for arbeidsbyrden brukes den imidlertid ved sensitivitetsbestemmelser av tuberkelbasiller. Det skyldes spesielle forhold som skal omtales nedenfor. Oppfinnelsen gjør det imidlertid mulig på en lettvent måte å bruke en titreringsteknikk ved sensitivitetsbestemmelser av tuberkelbasiller.

Arsaken til at sensitivitetsbestemmelser av tuberkelbasiller mot antibiotika adskiller seg fra andre bakteriers sensitivitetsbestemmelser, er tuberkelbasillenes relativt meget langsomme veksttempo. Dette forhold medfører blant annet at det ikke er hensiktsmessig å

sensitivitetsbestemme tuberkelbasiller med "lapp"metoden på konvensjonell måte.

Oppfinnelsen gjør det imidlertid mulig å bestemme tuberkelbasillers sensitivitet også ved måling av hemningssonenes størrelse. Det kan utføres ved å bruke et relativt langt og smalt, rektangulært legeme som bærer for et antibiotikum. Dette siste festes på innsiden av en kortside i legemet. Diffusjonen av vedkommende antibiotikum dirigeres av legemets form i et sammenpresset volum langs det rektangulære legemes lengdeakse. Hemningssonens lengde er et mål for sensitiviteten. Legemene kan ha en åpen eller lukket øvre avgrensning, i siste tilfelle som et flatt, gjennomsiktig tak. Dette dekke kan avdempe uttørring av substratet og minske infeksjonsrisikoen under den flere ukers lange inkubasjon ved 37°C, som er nødvendig for at veksten av tuberkelbasiller skal utvikle seg. I seg selv gir substratskålen med lokk ikke helt tilstrekkelig tetning til å beskytte mot en viss grad av uttørring ved en så vidt lang inkubasjon. Skålene må tettes sekundært (f.eks. med tape), eller de kan inkuberes oppbevart i f.eks. plastpose eller -eske. Disse tiltak kan unngås ved at legemene har en lukket øvre avgrensning.

Oppfinnelsen ligger meget vel til rette for en hensiktsmessig bruk av en serologisk teknikk, særlig en immundiffusjons- eller presipitasjonsteknikk. Denne meget viktige teknikk har en mangeartet og økende anvendelse, men den er tungvint og vanskelig å bruke i serieundersøkelser. Ved hjelp av oppfinnelsen vil teknikken på en lang rekke felter gjøres tilgjengelig for laboratorienes rutineundersøkelser og vil i vesentlig grad bidra til å øke informasjonsbredden vedrørende laboratorieundersøkelsene og øke deres betydning.

I stedet for å inokulere substratet (fortrinnsvis overflaten) med en bakteriekultur kan man i dette tilfelle spre et kvantum antigen eller antistoff ut over substratoverflaten eller tilblende det i substratet før opphelling i skålene, alt etter om legemene er bærere av henholdsvis antistoff eller antigen.

Ved en kvantitativ presipitasjonsteknikk inneholder de prefabrikerte legemer graderte kvanta av disse stoffer.

Det er bare når der ønskes bakteriell vekst, at substratet behøver å være et næringsmedium. Generelt sett skal det være et stoff som tillater diffusjon og altså er tilstrekkelig fast til å holde seg i form med en mikroporøs struktur, men samtidig kan penetreres av bærelgemene.

Det kan i visse tilfelle være tilstrekkelig eller ønskelig at legemene er utformet som lateralt delvis åpne legemer, f.eks. som rektangulære legemer hvor den ene kortside mangler, eller som buformede legemer. En slik utformning fungerer som en overgang mellom de helt åpne i og for seg kjente legemer (f.eks. papirskiver) og de ovenfor beskrevne legemer som omslutter et til alle sider lukket hulrom. Stoffene som skal diffundere, er festet i fondveggen av legemet, og diffusjonen dirigeres i sin første fase i en bestemt retning av legemets vegger. Når diffusjonen er kommet fri av legemets innflytelse, skjer den i alle retninger.

Legemene kan til dette formål få forskjellige former, som hver for seg er hensiktsmessige ved forskjellige spesifiserte diffusjonsforsøk. F.eks. kan det dreie seg om forskjellige immundiffusjonsforsøk. Videre kan det samme forhold være meget nyttig å ta i betraktning og gjøre bruk av når bakteriell vekst inngår i forsøket, f.eks. ved utprøving av synergisme eller antagonisme mellom antibiotika overfor bakterier. Denne undersøkelse er et meget viktig supplement til de vanlige sensitivitetsbestemmelser, og muligheten man har fått realisert for å inkludere en slik utprøving i de vanlige rutineundersøkelser, utgjør et viktig fremskritt.

Oppfinnelsen kan også brukes i forbindelse med undersøkelser hvor det inngår vekstfaktorer. På forhånd kan der være anbragt forskjellige vekstbefordrende stoffer i perifert lukkede bærelegemer. Etter plasering av legemene i det inokulerte substrat vil der ved diffusjon av stoffene inn i grunnlagssubstratet, som inneholdes i skålen, oppstå et nytt substrat av det som befinner seg i legemene. Det består av grunnlagssubstratet og én eller flere tilleggskomponenter, alt etter hvor mange vekstbefordrende stoffer som er anbragt i legemet. I én skål oppnår man derved forskjellige substrater. Man observerer så om den inokulerte bakteriekultur i de forskjellige legemer reagerer med rikelig, uforandret eller eventuelt nedsatt vekst som en reaksjon på tilførselen av de forskjellige stoffer. Teknikken kan brukes i diagnostisk eller i eksperimentelt øyemed.

I det hele tatt vil oppfinnelsen kunne brukes i forbindelse med mange slags undersøkelser hvori der inngår kjemiske, diffunderbare stoffer som på karakteristisk, optisk observerbar måte inngår forbindelse med bakterieveksten eller stoffskifteprodukter dannet under veksten. En eller flere substanser kan være tilsatt legemene på forhånd.

Noen undersøkelsesmetoder krever sekundær tilsetning på reaksjonsstedet av et bestemt stoff (eller flere) etter egnet tid (egnede tider) i reaksjonsforløpet, f.eks. etterat inkubasjon for vekst har funnet sted. En slik teknikk lar seg gjennomføre med oppfinnelsen. Ved hjelp av en dispenser kan den sekundære tilsetning utføres i samme mønster som primærplaseringen ble foretatt i. Herunder blir papirskiver eller andre egnede legemer som inneholder det eller de stoffer som ønskes tilsatt, plasert i primærlegemenes rom. En annen mulighet for sekundær tilsetning er å bruke en innretning med mange inokulasjonspunkter eller pipetter anordnet i det samme mønster som de primært tilsatte legemer er plasert i.

Denne teknikk med sekundær tilsetning av stoffer etter passende tidsrom kan gjennomføres med legemer inneholdende et stoff som forekommer i en gradert serie av konsentrasjoner fra legeme til legeme. Der åpnes derved mulighet for å tilpasse fremgangsmåten til forskjellige, relativt kompliserte titreringsteknikker som idag utføres med flytende stoffer i et reagensrør. Dette gjelder også f.eks. for slike reaksjoner hvor røde blodlegemer benyttes til å bevirke hemolyse eller hægglutineringsmiddel ved bestemmelse av titergrenser. De røde blodlegemer kan sekundært påføres overflaten av substratet i bærelagemene, eller de kan være tilblandet substratet på forhånd. Substratet kan ha en meget enkel sammensetning. Det kan tilpasses de eksisterende krav. Konsentrasjonen f.eks. av agaren kan likeledes tilpasses forholdene. F.eks. kan den være relativt lav. Substratet kan også inneholde andre stoffer som inngår i reaksjonene i konstant mengde fra reaksjon til reaksjon på samme måte som blodlegemene. Alternativt kan titreringsteknikken utføres ved at de sekundært tilsatte stoffer brukes i trinnvise konsentrasjoner, mens stoffene som inneholdes i bærelagemene, i dette tilfelle danner en serie med konstant konsentrasjonsnivå.

De enkelte bærelagemer behøver ikke å inneholde bare ett stoff, men kan også inneholde flere. Stoffene kan da foreligge samlet eller være plasert separat på forskjellige fra hinannen isolerte steder i bærelaget forat der ikke skal skje reaksjon mellom stoffene før de diffunderer ut i substratet.

Legemene kan også, særlig for eksperimentelle anvendelser, lages uten tilsetning av stoffer under fabrikkasjonsprosessen, men med mulighet for tilsetning av ønskede stoffer etterat legemene er bragt på plass i substratet. Legemene kan til dette formål være forsynt med

f.eks. en traktformet tilførselskanal ned til et godt drenert rom i legemets vegg, hvor der på forhånd eventuelt kan være plasert et absorberende papir. Også disse legemer kan ha forskjellige former som hver for seg er hensiktsmessige ved forskjellige spesifiserte diffusjonsforsøk, f.eks. ved undersøkelse av presipitasjonsmønstre, utprøving av synergisme eller antagonisme mellom antibiotika eller undersøkelse av vekststoffer. Videre kan også disse legemer foruten å omslutte et hulrom som er lukket til alle sider, være delvis åpne. Hensikten er å gi forskere et teknisk hjelpemiddel som kan fremme mulighetene og lette arbeidet for dem i det vide eksperimentalfelt som immun-diffusjonsteknikken og bakteriologien dekker.

Metoden gjør det dessuten mulig lettvint å bestemme konsentrasjonsnivåer av antibiotika i vevsvæsker.

Metoden ifølge oppfinnelsen er meget fleksibel i sin anvendelse. Den kan brukes både ved stoffer som sprer seg raskt, og ved slike som sprer seg langsomt i substratet. Den åpner store muligheter ved at mange forskjellige reaksjoner og typer av reaksjoner kan tilpasses teknikken med dens store iboende fordeler, som skal omtales mere utførlig nedenfor.

Metoden kan gjennomføres under utnyttelse av prinsipper som der er gjort rede for i søkerens eldre patentsøknader nr. 166.874 og 1326/69. De fordeler som er omtalt i disse søknader, vil også kunne komme den foreliggende metode til gode. De vedrører automatisering av laboratoriearbeidet og primærnoteringen av data under hensyntagen til en faglig sett ønskelig eller nødvendig, personlig og visuell styring og kontroll. De vedrører videre mulighetene for å etablere direkte kontakt med et EDB-anlegg med de enorme fordeler det byr på. Gjennom den foreliggende oppfinnelse vil disse prinsipper kunne finne en mer generell og utstrakt anvendelse og komme en lang rekke forskjellige mikrobiologiske, serologiske, immunologiske, klinisk-kjemiske og lignende undersøkelsesteknikker eller tester til gode.

En undersøkelsesteknikk som tilpasses oppfinnelsen, vil også gi andre fordeler enn dem som er nevnt ovenfor. De refererer seg dels til selve det laboratorietekniske arbeide, dels til substrattilvirkning og renhold, dels til lager- og transportplass og endelig til sikkerhetsmessige forhold som unngåelse av feil og forveksling.

Der skal bli gjort nærmere rede for disse forhold under henvisning til den ovenfor omtalte teknikk ved bakteriell forgjæring av sukkerarter. Oppfinnelsen vil føre med seg bare én utsæd for hele

serien av sukkerarter, mot nå én utsæd for hver enkelt sukkerart - eller ved klassifiseringsforsøk undertiden for to eller tre arter. Foruten arbeidsbesparelsen når det gjelder selve inokulasjonen, får man andre av mer sekundær art. Man får blant annet bare ett lokk, nemlig petriskålens, å ta av og sette på, mot nå en dott eller et deksel for hvert buljongrør, svarende til det antall sukkerarter man inokulerer. Videre får man alle forgjæringsundersøkelsene samlet i en grei, lett håndterlig og plassbesparende enhet, petriskålen, mot den nå noe urydige, tungvinte og plasskrevende situasjon med alle de enkelte buljongrør som skal håndteres og fordeles etter hverandre i støttehullene i et stativ. Nok en hemsko i denne forbindelse er at de enkelte buljongrør med de forskjellige sukkerarter er like og adskilles bare ved en etikett med sukkerartens navn. Relativt sett har man få substratskåler å håndtere, og alle er av samme slag, mens man nå har mange buljongrør, ytre sett like, men inneholdende sukkerarter av forskjellige slag.

Mens avlesning og notering ved den nye teknikk kan foregå automatisk under visuell kontroll eller helautomatisk, vil disse arbeidsprosesser være relativt meget brysomme og tidskrevende på konvensjonell måte. De forskjellige forgjæringsrør som står i tette rekker og kolonner i et stativ, ordnet dels etter prøvens art og dels etter sukkerart, må manuelt frigjøres ett for ett for avlesning av utfall og identitet. Deretter noteres disse data manuelt.

Med konvensjonell teknikk er risikoen for feil relativt stor. Det gjelder avlesning og notering av data. Videre gjelder det den forutgående inokulasjon. Denne blir gjentatt for hvert buljongrør i serien. Ved en feiltagelse kan et rør muligens bli forbigått, eller det kan bli inokulert fra en øse som ikke har nok inokulat til befordring av vekst. Derved oppstår falske resultater.

Feil og forveksling kan opptre også på et tidligere stadium. De kan finne sted når den tekniske assistent henter sukkerartbuljongrørene. Disse blir oppbevart i kjøleskap i separate samleenheter for hver av sukkerartene. Imidlertid kan det hende at ubrukte rør som settes tilbake i kjøleskapet, kan være feilaktig plasert i en enhet med en annen sukkerart på grunn av ytre likhet. Derfor må hvert rør kontrolleres.

Videre kan feil og forveksling finne sted i substratavdelingen under tilvirkning av sukkerartbuljongene. De kan finne sted også under etiketteringen eller transporten til kjøleskap.

Det tidligere nevnte faktum at der medgår relativt mange sukkerartbuljonger til forgjæringsundersøkelser, øker mulighetene for

feil. Dette er særlig tilfelle når det dreier seg om flere prøver som skal undersøkes. Teknikken ifølge oppfinnelsen fører derimot til at man relativt sett håndterer få petriskåler, og alle er av samme slag.

Oppfinnelsen vil medføre en betydelig besparelse av plass, både under lagerhold i laboratoriet og under intern og ekstern transport og forsendelse. De små legemer lagret i magasiner, er kompakte enheter i motsetning til samlingen av individuelle, relativt store og uhåndterlige rør. Disse nødvendiggjør plasskrevende stativer som må holdes rene og frie for smitte. Ofte er rørene av glass som etter bruk krever autoklaving, vask og sterilisering før de kan benyttes om igjen.

Derimot er det etter bruk enkelt å fjerne og destruere petriskålene og med dem legemene som er plasert i substratet. Under vekkbringelsen er det en betydelig fordel å kunne bruke de lite plasskrevende enheter som oppfinnelsen muliggjør.

Meget fordelaktig er det også at oppfinnelsen til ulike forsøk muliggjør bruken av et meget enkelt og standardisert substrat.

Utførelsen av oppfinnelsen vil i det følgende bli anskueliggjort nærmere under henvisning til tegningen.

Fig. 1 er et grunnriss av en petriskål med bærelegemer innsett for utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og med lokket gjennomskåret etter linjen I-I på fig. 2.

Fig. 2 viser tilsvarende vertikalsnitt etter linjen II-II på fig. 1.

Fig. 3 - 5 viser forskjellige utførelsesformer av bærelegemer i aksialt snitt.

Fig. 6 er et oppriss av enda en utførelsesform.

Fig. 7 viser enda en utførelsesform perspektivisk.

Fig. 8 viser enda en utførelsesform i oppriss og delvis aksialsnitt.

Fig. 9 viser enda en utførelsesform i aksialsnitt.

Fig. 10 og 11 viser perspektivisk hver sin utførelsesform.

Fig. 12 viser loddrett tverrsnitt av bærelegemet på fig. 10, tatt etter linjen XII-XII.

Fig. 13 og 14 viser enda en utførelsesform i henholdsvis grunnriss og oppriss.

Fig. 15 viser enda en utførelsesform perspektivisk.

Skjønt fremgangsmåten som omtalt kan benyttes til mange forsøk og undersøkelser, vil der i det følgende i første rekke bli gjort rede for bestemmelse av bakterier på grunnlag av deres forgjæring av forskjellige sukkerarter.

Sukkerartene tilføres et fast eller halvfast mikroporøst substrat som er inokulert med de bakterier som skal undersøkes. De tilføres ved hjelp av bærelegemer i henhold til oppfinnelsen, f.eks. som det der er vist på fig. 3. Dette omfatter et rørformet legeme 3 som på innsiden er forsynt med et fórt 4 inneholdende en sukkerart som skal benyttes ved undersøkelsen, og eventuelt en indikator, hvis denne ikke inneholdes i substratet. 5 betegner en ferromagnetisk ring som er anbragt nedentil på det rørformede legeme. Ved hjelp av en eller flere permanentmagneter eller elektromagneter skal man dermed kunne trekke de rørformede legemer på plass gjennom substratet i en petriskål. Denne plassering er vist på fig. 1 og 2. Petriskålen er her betegnet med 1. Substratet som er inokulert med de bakterier man ønsker å bestemme, er betegnet med 2. Seks rørformede legemer av den type som er vist på fig. 3, er bragt ned i substratet. Hvert legeme 3 har et fórt 4 med sin egen sukkerart. Den er forskjellig fra legeme til legeme i substratskålen. Utfallet av forgjæringsreaksjonen (hvilke sukkerarter, om noen, som forgjærer) er et diagnostisk hjelpemiddel ved bestemmelse av bakterien. En forgjæring markerer seg ved indikatoromslag. Et slikt omslag er vist i det substrat som er omsluttet av legemet 3' på fig. 1. Forgjæringen som fører til indikatoromslaget, kommer igang etter at de enkelte sukkerarter, resp. indikatoren, i de forskjellige fórt 4 i de seks legemer, er diffundert inn i de substratporsjoner som hver for seg omsluttet av de enkelte rørformede legemer.

Fóret 4 kan være av f.eks. papir eller cellulose, og det hviler mot et trinn nedentil i det rørformede legeme 3.

Hvis fórets plass inntas av en vegglamell som er perforert, og denne lamell danner indre begrensning av et hulrom i rørets vegg, får man et bærelegeme som vist på fig. 4. Sukkerarten er plasert i hulrommet. Enten forekommer sukkerarten der som sådan, eller den forekommer oppsuget i et fórt eller tilblandet en inert masse. Den diffunderer gjennom den perforerte lamell og inn i det substrat som er omsluttet av det rørformede legeme, når dette er på plass i det inokulerte substrat.

Istedenfor å benytte perforeringer eller porøse fórt er det også tenkelig å påføre legemene innvendige belegg som inneholder virkestoffene.

De rørformede legemer 3 og 4 kan være av forskjellige hensiktsmessige materialer, f.eks. av plast. Denne kan ha innlagte eller innstøpte ferromagnetiske deler som nevnt ovenfor, eller røret kan være laget av ferromagnetisk materiale, f.eks. av stål.

Det rørformede legeme kan også ha en ferromagnetisk krave anbragt oventil rundt røret som antydnet ved 12 på fig. 5, hvor hele veggen i det rørformede legeme, inklusive kraven, består av ferromagnetisk materiale. Legemet har forøvrig en noe mer prosjektillignende utformning enn det på fig. 3. På fig. 6 er det vist en ferromagnetisk krave 12 med trekantet tverrsnitt, anbragt på et rørformet legeme av den art som f.eks. fig. 3 viser.

Skulle der være behov for å gjøre legemet mer stabilt, kan det forsynes med f.eks. fire støtteben som antydnet ved 13 på fig.

7.

Utførelsesformen på fig. 8 har et prosjektillignende legeme 10 anbragt sentralt i det rørformede legeme 3. Det prosjektillignende legeme bæres ved hjelp av et kors 11. Prosjektilet kan utvendig ha et belegg hvor det diffunderbare aktive stoff forefinnes, tilsvarende som i føret 4 på innsiden av det rørformede legeme. Derved oppnås der hurtig diffusjonslikevekt i substratmassen.

Alternativt kan de diffunderbare stoffer i føret 4 og på overflaten av prosjektilet 10 være av forskjellig natur.

Prosjektilet kan være hult og perforert. Det diffunderbare stoff kan være blitt anbragt i hulrommet enten under fabrikkasjonsprosessen eller først senere. Legemene fabrikeres til det siste formål uten aktive stoffer i prosjektilene. Det imøtekommer situasjoner, f.eks. visse eksperimentelle, hvor den som utfører eksperimentene, selv ønsker å anbringe de stoffer som skal utprøves. Det gjør man ved å dryppe dem ned i de hule prosjektiler.

Også anordningen vist på fig. 9 kan være egnet til eksperimentelle formål ut fra den samme motivering for anvendelse som ovenfor. Tildrypningen av det diffunderbare aktive stoff skjer oventil ved 8 ned i den traktformede utvidelse av det rørformede legeme 3. Stoffene diffunderer inn i substratmassen gjennom det perforerte parti 7 av legemets sentrale rørformede del, mens det uperforerte øvre parti 9 hindrer stoffene i å sive ut på overflaten av substratet.

Med rørformede legemer menes her også legemer som ikke har sirkelsylinderform, f.eks. legemer i form av en langstrakt kasse som vist på fig. 10. En slik form av legemet er fordelaktig hvis man vil lede diffusjonen i en bestemt retning. Det oppnår man ved å anbringe det preparerte før ved den ene kortvegg som antydnet ved 4 på figuren. Diffusjonen vil da forplante seg på langs av legemet 3 mot den annen kortvegg. Er førene anbragt på langsiden på en eller begge sider som antydnet med 14, vil man hurtig få etablert diffusjonslikevekt. Som vist

124603

på fig. 12 er det rektangulære legeme på fig. 10 uten bunn og deksel, og i legemet kan der være innleiret ferromagnetisk materiale 15. Videre kan legemet være forsynt med tak når der er behov for det.

Fig. 11 viser en annen utførelsesform av et langstrakt, rektangulært legeme 3, hvor midtpartiet er delt i fire like rom som hvert kan ha fôr med forskjellige stoffer. Et snitt gjennom legemet på fig. 11 vil ha samme utseende som vist på fig. 12 for legemet på fig. 10.

I de viste utførelseseksempler er et av formålene med oppfinnelsen å holde reaksjonen begrenset til et bestemt område. Legemer i henhold til oppfinnelsen kan imidlertid også utføres slik at bare første stadium av diffusjonen foregår kontrollert og retningsbestemt, men sluttstadiet fritt og uregulert. Et eksempel på dette er vist på fig. 13 og 14. Legemet er i dette tilfelle på utsiden forsynt med langsgående fordypninger 16 som er utstyrt med små borer 18. Disse fører inn i større, langsgående borer 19. Enten kan disse borer allerede under fabrikkasjonsprosessen være blitt forsynt med aktive stoffer, eller de kan først under undersøkelsen få tilført de stoffer man er interessert i å bruke eller undersøke. Det kan man gjøre ved å dryppe dråper av stoffene ned i de langsgående borer.

Stoffene vil etterhvert diffundere ut i substratet gjennom boringene 18. Under diffusjonen videre utover vil retningen bli bestemt av formen og størrelsen av det buede parti. Først i et senere stadium, når spredningen er kommet fri fra innflytelsen av den omgivende avgrensning, blir den ukontrollert i alle retninger.

Legemet kan også utføres som forklart under henvisning til fig. 4 og 9, med en perforert vegg som avgrenser et kammer hvori de aktuelle stoffer kan innføres. Eller legemet kan utføres uten kamre og gjennombrytninger i veggene. De aktuelle stoffer kan isåfall inneholdes i fôr anbragt i fordypningene 16.

Det legeme som er vist på fig. 13, er sentralt hult. Legemet kan også utformes uten dette hulrom, men det bør da få en så vidt slank utformning at det ikke bevirker sprekkdannelse i det omliggende substrat under eller etter nedføringen.

På fig. 15 er der vist et stjerneformet legeme. Også dette legeme sørger for diffusjon av stoffene etter et fastlagt mønster. De aktuelle stoffer er påført i vinklene 17, f.eks. i form av et tilmålt kvantum av en pasta inneholdende det respektive stoff i bestemt konsentrasjon.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåte ved utførelse av diffusjonsprøver i mikrobiologisk, immunologisk og lignende laboratoriearbeide hvor virkestoffer ved hjelp av egnede bærelegemer bringes i kontakt med et fast substrat, k a r a k t e r i s e r t ved at man anvender bærelegemer som er utformet med en i vertikalretning hovedsakelig rettlinjet, diffusjonstett vegg som har underkanten hovedsakelig fortløpende i et plan og er formet for i det minste delvis å inngrense et areal på sin ene side, og driver bærelegemene til bunns i substratet, hvortil virkestoffet avgis på den nevnte side ved at bærelegemet på forhånd bærer virkestoffet på denne side eller har kanaler eller porer hvorigjennom virkestoffet ledes inn, hvorved virkningen i substratet blir begrenset til et av veggen helt eller delvis omsluttet observerbart område.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at der i ett og samme substrat bringes til virkning graderte konsentrasjoner av samme virkestoff, inneholdt i hvert sitt bærelegeme, resp. i hver sin avgrensede avdeling av samme bærelegeme.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t ved at substratets dybde og høyden av bærelegemenes diffusjonstette vegger velges slik i forhold til hverandre at disse vegger i innført stilling strekker seg opp over substratet.
4. Virkestoffbærende legeme for utførelse av en fremgangsmåte som angitt i et av de foregående krav, omfattende en diffusjonstett sidevegg som har underkanten i det minste tilnærmedesvis liggende i et plan og helt eller delvis omslutter et nedentil åpent rom, k a r a k t e r i s e r t ved at en til dette rom grensende flate av legemet er forsynt med et belegg inneholdende virkestoffet eller er utformet med fine kanaler eller porer egnet til å avgi deri inneholdt eller gjennomledet virkestoff til substratet i det nevnte rom.
5. Bærelegeme som angitt i krav 4, k a r a k t e r i s e r t ved at der mellom rommets begrensingsflate og den diffusjonstette vegg er utformet et oppad åpent og nedentil lukket hulrom innad begrenset av en vegg med fine kanaler eller porer eller inneholdende en porøs fylling som holdes på plass av en gjennombrudt innervegg.
6. Bærelegeme som angitt i krav 4, k a r a k t e r i s e r t ved at veggen er forsynt med en porøs foring grensende til det nevnte rom.

124603

7. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 6, k a r a k - t e r i s e r t ved at den porøse eller med kanaler forsynte flate i det minste delvis dannes av et organ plasert i avstand innenfor veggen og forbundet med denne ved strevere.
8. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 7, k a r a k - t e r i s e r t ved at det nevnte rom er åpent oventil eller har gjennomsiktig tak.
9. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 8, k a r a k - t e r i s e r t ved at den diffusjonstette sidevegg har form av en hylse.
10. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 8, k a r a k - t e r i s e r t ved at det i grunnriss helt eller delvis inngrenser flere rom og er innrettet til å avgi virkestoff til hvert av disse.
11. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 8, k a r a k - t e r i s e r t ved at det har avlang grunnriss-form og eventuelt er forsynt med tverrvegger for oppdeling i samsvar med krav 10.
12. Bærelegeme som angitt i krav 10, k a r a k t e r i s e r t ved at det har flere loddrette veggfløyer sammensatt i stjerneform og er innrettet til å avgi virkestoff til hvert av de derved fremkomne delvis omsluttete rom.
13. Bærelegeme som angitt i et av kravene 4 - 12, k a r a k - t e r i s e r t ved at den øverste del av rommets begrensingsvegg er tett.

Anførte publikasjoner:

Norsk patent nr. 112.151
Fransk patent nr. 1.371.375
Sveitsisk patent nr. 433.603
Svensk patent nr. 119.740
U.S. Patent nr. Re 24.557, 2.998.353. 3.401.087

124603

FIG.1

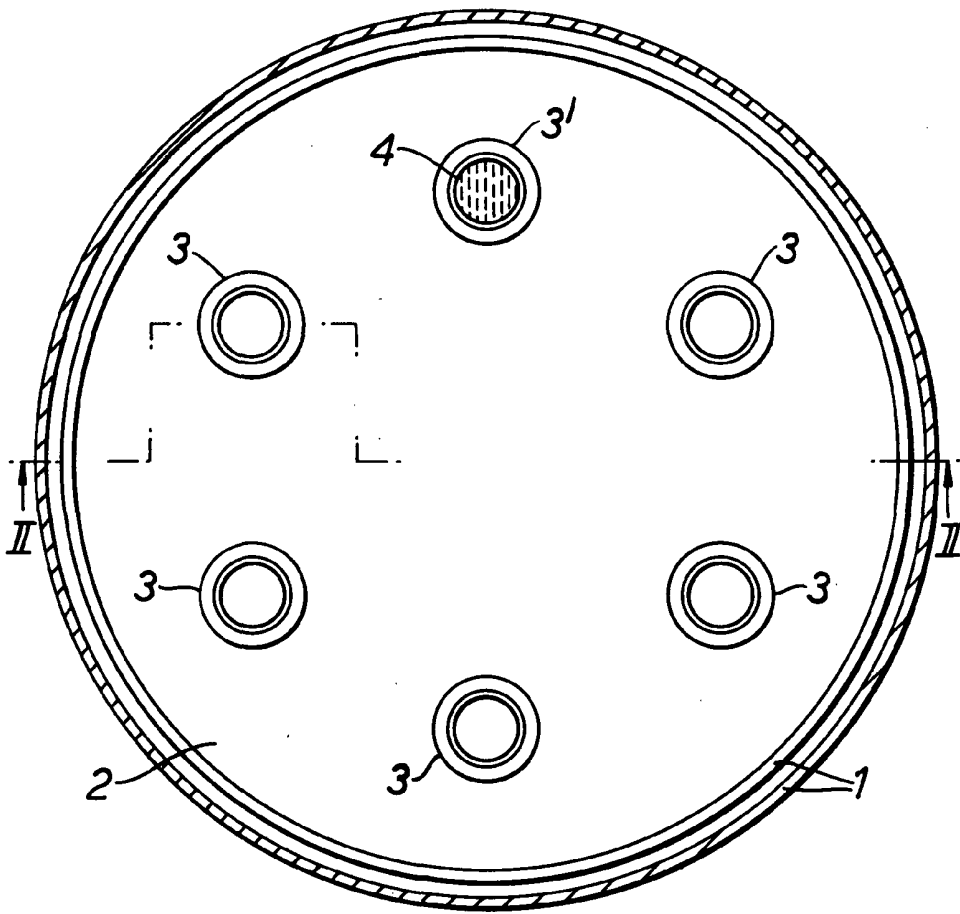
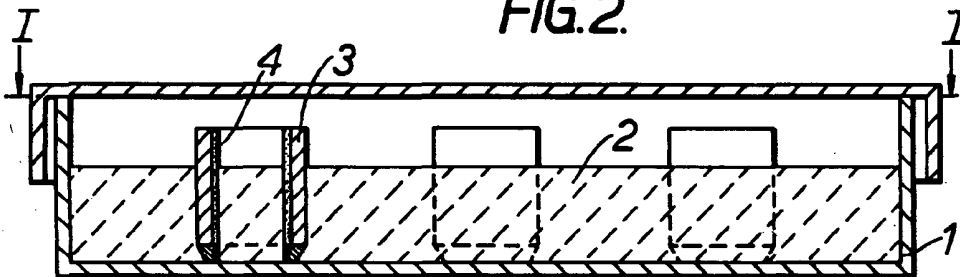
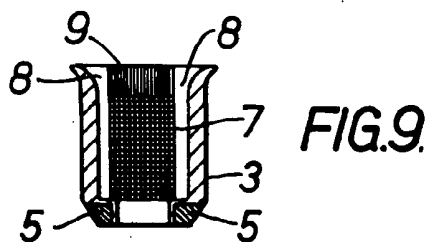
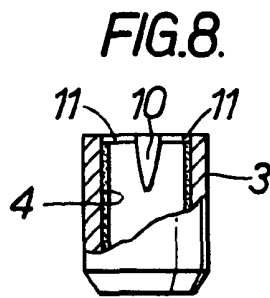
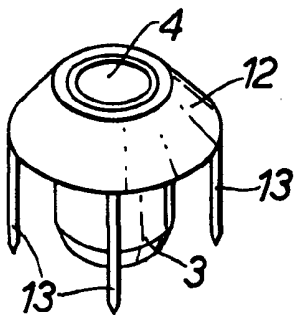
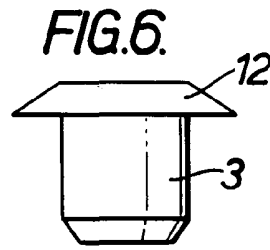
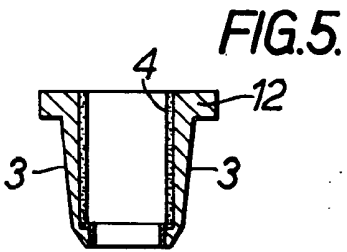
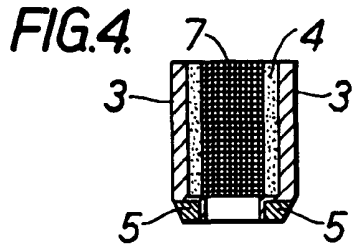
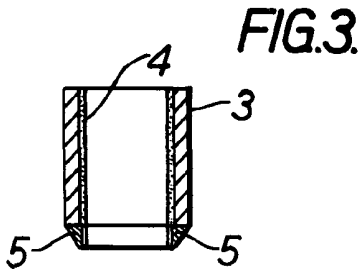


FIG.2





124603

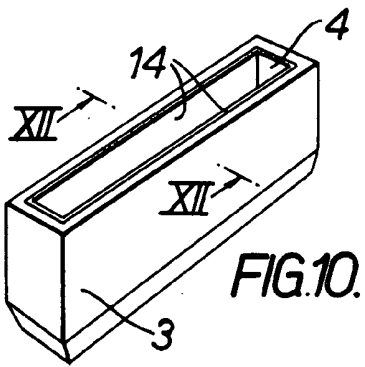


FIG. 10.

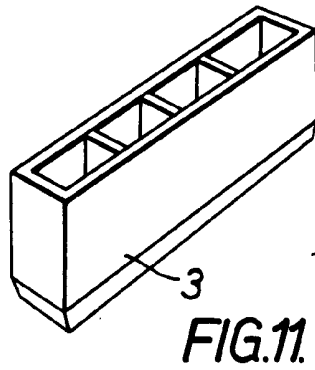


FIG. 11.

FIG. 12.

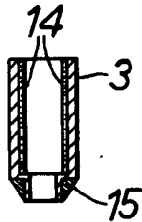


FIG. 13.

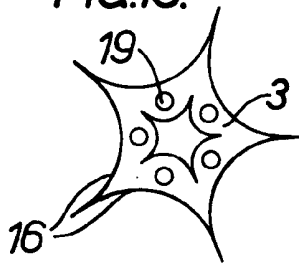


FIG. 14.

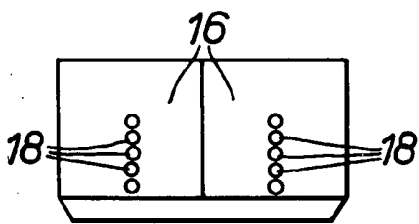


FIG. 15.

