

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 530 814**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②1 N° d'enregistrement national : **82 13042**
⑤1 Int Cl³ : G 01 N 1/28, 33/18.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** A1

②2 Date de dépôt : 21 juillet 1982.

③0 Priorité

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 4 du 27 janvier 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *ASTEC*. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Patrick Bleuse, Pierre-André Trinel, Gérard
Leroy et Yves Moschetto.

⑦3 Titulaire(s) :

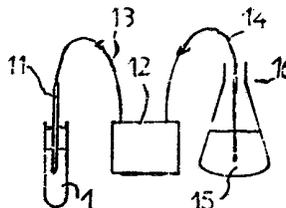
⑦4 Mandataire(s) : Bugnion.

⑤4 Procédé de dilutions stériles.

⑤7 L'invention est relative à un procédé de dilutions stériles
et à un dispositif de mise en œuvre du procédé.

Selon l'invention, l'aiguille 11 qui sert au prélèvement est
stérilisée entre chaque dilution successive. La contamination de
l'aiguille est localisée aussi bien extérieurement qu'intérieure-
ment en effectuant les prélèvements de liquide en régime
laminaire à l'intérieur de l'aiguille.

L'invention trouvera tout particulièrement son application
dans le domaine des contrôles bactériologiques de l'eau et des
produits alimentaires.



FR 2 530 814 - A1

- 1 -

L'invention est relative à un procédé de dilutions stériles et à un dispositif de mise en oeuvre du procédé. Elle trouvera notamment son application dans le domaine du contrôle bactériologique de l'eau et des aliments.

5 Actuellement, les méthodes traditionnelles de contrôle bactériologique nécessitent l'emploi d'une main d'oeuvre abondante pour des travaux longs et fastidieux. En effet, les différentes dilutions successives sont réalisées manuellement à l'aide de pipettes qui, en raison de la grande difficulté de leur stérilisation doivent être jetées après
10 un usage unique ce qui rend l'opération très coûteuse. De plus, la précision des dosages est très relative du fait que ces dosages sont fonction de l'habileté et l'appréciation du manipulateur.

Dans le domaine de la biochimie, il a été créé de nombreux automates qui permettent de réaliser automatiquement des dilutions,
15 toutefois, ces appareils ne sont pas adaptés au domaine de la bactériologie qui pose deux difficultés importantes :

- une bactérie piégée peut, par une culture rapide, fausser complètement les résultats d'une manipulation ;

- l'ensemble du dispositif doit se préserver de l'introduction
20 de germes extérieurs et rester stérile.

Ces deux obstacles ne peuvent être surmontés à l'heure actuelle avec les matériels adaptés à la biochimie qui ne présentent aucun moyen de stérilisation et aucune protection vis-à-vis des agents extérieurs.

Le but principal de la présente invention est de présenter
25 un procédé de dilution stérile qui soit parfaitement adapté pour être automatisé et donc pour l'obtention de stérilisations à faible coût de revient. Contrairement aux usages actuels dans lesquels le matériel, en particulier, les pipettes doivent être éliminées à chaque opération, dans le procédé de l'invention, les équipements mis en oeuvre sont
30 dotés de moyens qui empêchent toute contamination même locale et donc qui garantissent les résultats.

Un autre but de la présente invention est de présenter un dispositif de mise en oeuvre de la présente invention qui a été conçu pour effectuer en automatique les différentes dilutions. Le dispositif
35 est parfaitement adapté aux appareils existants sur lesquels il peut être adapté aisément.

D'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront au cours de la description qui va suivre, qui n'est cependant

- 2 -

donnée qu'à titre indicatif et qui n'a pas pour but de la limiter.

Le procédé de dilutions stériles successives pour cultures bactériennes dans lequel on prélève une certaine quantité de liquide du milieu bactérien primaire à l'aide d'une aiguille reliée à un dilu-
5 teur, on injecte la quantité prélevée additionnée d'un liquide de dilution dans une éprouvette secondaire, est caractérisé en ce que l'on stérilise la partie de l'aiguille où est localisée la contamination avant de la réutiliser pour prélever un échantillon de liquide dans l'éprouvette secondaire et l'injecter dans une éprouvette tertiaire avec
10 une addition de liquide de dilution.

L'invention sera mieux comprise si l'on se réfère à la description suivante ainsi qu'aux dessins en annexe qui en font partie inté-
grante.

La figure 1 schématise les différentes étapes d'une dilution
15 successive.

Les figures 2a à e représentent les différentes étapes d'un cycle du procédé de dilutions stériles successives de l'invention.

La figure 3 représente la localisation du milieu bactérien à l'intérieur de l'aiguille.

20 La figure 4 représente une vue en coupe du four de l'invention selon un mode préférentiel de réalisation de celui-ci.

La figure 5 représente le dispositif d'articulation de la potence qui supporte l'aiguille.

25 La figure 6 représente une vue de dessus du collecteur de fraction équipé du dispositif d'articulation de l'aiguille.

Le principe d'une dilution stérile est schématisé à la figure 1. Il consiste à prélever dans un milieu bactérien primaire 1 une frac-
tion 2 de la solution bactérienne 1 et de la placer dans une éprouvette
secondaire 3 en y ajoutant un volume prédéterminé mais réglable de di-
30 luant 4 pour former un milieu bactérien 5 secondaire qui doit être homogène.

Puis, on renouvelle l'opération en effectuant un prélèvement 6 dans la solution bactérienne secondaire 5, on introduit la quantité
prélevée 6 dans une éprouvette tertiaire 7 en y additionnant un volume
35 déterminé 8 de diluant pour former une solution bactérienne diluée tertiaire 9 homogène.

On renouvelle ainsi successivement l'opération jusqu'à obtenir généralement après neuf prélèvements, une solution bactérienne 10 très

largement diluée puisque le rapport de dilution à chaque opération est généralement de l'ordre 1/10, et qui peut donc servir très facilement pour une opération de dénombrement ou qui peut être mis en culture par addition d'un milieu de culture.

5 Il faut noter, qu'en général, ignorant de façon précise la concentration du milieu bactérien primaire 1, on choisira parmi les différents milieux bactériens dilués obtenus, ceux qui sont les plus adaptés à l'usage désiré, par exemple, pour une opération de dénombrement.

10 Toutefois, une remarque importante s'impose, en effet, puisqu'il s'agit de milieux bactériens, il est important que l'ensemble de ces opérations soit effectué stérilement. En effet, la moindre bactérie piégée qui serait introduite par accident dans un milieu bactérien pourrait, par un développement rapide, fausser complètement les résultats de la manipulation.

15 Pour ce faire, actuellement, les opérations sont réalisées au-dessus d'une flamme en utilisant une pipette qui est jetée après chaque dilution unitaire, ce qui entraîne une consommation importante de ce matériel.

20 Selon le procédé de la présente invention, on stérilise entre chaque opération la partie de l'appareil qui a été contaminée lors des prélèvements. Ainsi, l'introduction éventuelle de germes est évitée par la stérilisation et d'autre part le matériel utilisé est conservé, ce qui minimise les coûts de revient et facilite l'automatisation du procédé.

25 Les figures 2a à 2e schématisent le cycle d'une dilution stérile selon le procédé de l'invention.

30 La figure 2a représente l'opération de prélèvement dans laquelle on prélève une certaine quantité du liquide du milieu bactérien 1 à l'aide d'une aiguille de prélèvement 11 qui est reliée à un diluteur 12 de type classique.

35 Les diluteurs sont des pompes doseuses bi-directionnelles qui permettent d'aspirer ou de refouler dans un tube 13 une certaine quantité de liquide. Le refoulement dans le tube 13 peut être réalisé en injectant dans ce tube un liquide prélevé par un second capillaire 14 qui trempe par exemple dans un liquide de dilution 15 contenu dans un récipient 16.

Ainsi, durant l'étape de prélèvement, on aspire à l'aide de

- 4 -

l'aiguille 11 une quantité de la solution bactérienne primaire 1 qui correspond à l'échantillon 2 de la figure 1.

5 L'étape suivante, illustrée à la figure 2b, consiste à injecter la quantité prélevée lors de l'étape précédente dans une éprouvette secondaire 3 en y additionnant une certaine dose de liquide de dilution prélevée dans le récipient 16. Le refoulement est actionné par le diluteur 12 relié à l'aiguille de prélèvement 11 par le tube 13.

10 La solution bactérienne secondaire 5 ainsi obtenue devra présenter des qualités d'homogénéité. Ceci pourra être obtenu en choisissant de façon appropriée la hauteur de l'éprouvette. Il pourra, par exemple, être utilisé de l'eau physiologique lorsque la dilution doit être pratiquée sur une culture bactérienne elle-même en suspension dans de l'eau.

15 Dans certains cas, l'homogénéité de la solution secondaire 5 pourra être obtenue à l'aide d'agitateurs ou tout autre moyen approprié.

20 L'aiguille de prélèvement 11 qui a été en contact direct avec la solution bactérienne primaire 1 doit être stérilisée pour être utilisable dans la solution bactérienne diluée 5 et ainsi éviter tout risque d'introduction de bactéries qui resteraient piégées sur sa partie externe ou interne.

25 Cette opération est réalisée telle qu'illustrée à la figure 2c en introduisant l'aiguille de prélèvement 11 dans un four 17 dont la température est largement supérieure à la limite de résistance des bactéries. En pratique, le four électrique chauffe à plus de 1.000 °C, ce qui permet de stériliser l'aiguille en quelques secondes.

Il faut noter que, durant cette étape de stérilisation, ce qui est stérilisé c'est la partie de l'aiguille 11 où a été localisée la contamination.

30 La figure 2d représente l'étape de rinçage suivante. Pour effectuer cette opération, le diluteur est actionné de façon à éjecter par l'aiguille de prélèvement 11 une certaine quantité de liquide de dilution prélevée dans le récipient 16. Ceci permet de rincer l'intérieur de l'aiguille en la nettoyant et, d'autre part, par la même occasion, cela refroidit l'aiguille et la rend donc susceptible d'être plongée dans un milieu bactérien sans en détruire les bactéries.

35 A l'issue de cette étape, le dispositif de prélèvement est donc entièrement stérilisé et peut donc à nouveau être utilisé pour effectuer une nouvelle dilution. C'est ce qui est illustré à la figure

- 5 -

2e dans laquelle on replonge l'aiguille de prélèvement 11 dans le milieu bactérien secondaire 5 pour effectuer un prélèvement qui sera suivi des différentes opérations qui ont été énumérées précédemment pour effectuer une dilution tertiaire avec stérilisation à l'issue de cette dilution.

Dans la pratique, il est généralement effectué des prélèvements de l'ordre de 1 ml avec des rejets dilués de l'ordre de 10 ml.

Durant l'étape de stérilisation de l'aiguille de prélèvement 11, il a été utilisé un four mais il est évident que d'autres moyens de stérilisation tels que par exemple les ultra-sons peuvent également être utilisés.

Il faut remarquer, que le procédé de dilution tel qu'il vient d'être décrit n'est exploitable que dans la mesure où la contamination de l'aiguille a été localisée, ce qui permet de la stériliser avec certitude. Pour cela, un certain nombre de précautions doivent être prises, et, en particulier, le mode opératoire suivant devra être, de préférence, utilisé.

En ce qui concerne la partie extérieure de l'aiguille 11 de prélèvement qui a été en contact avec le milieu bactérien, celle-ci peut être déterminée avec précision et dépend notamment de la profondeur avec laquelle l'éprouvette a été plongée dans la solution bactérienne. Par conséquent, en ce qui concerne la stérilisation de la partie externe de l'aiguille de prélèvement 11, il suffira de prendre la précaution de faire pénétrer dans le four 17 au moins cette partie.

Par contre, en ce qui concerne la stérilisation de la partie interne de l'aiguille, celle-ci est plus délicate à réaliser étant donné que le milieu liquide contenu à l'intérieur de l'aiguille 11 minimise son échauffement, en se vaporisant partiellement. Et donc, la stérilisation de la partie interne de l'aiguille est progressive au fur et à mesure de la vaporisation de son contenu, ce qui nécessite un temps d'introduction dans le four 17 relativement long si l'on désire vaporiser et donc stériliser une longueur intérieure importante de l'aiguille.

Or, il est possible de minimiser la contamination interne de l'aiguille en localisant cette contamination uniquement dans la partie inférieure de l'aiguille 11.

Les lois de la mécanique des fluides nous enseignent que, pour des écoulements de liquide en régime laminaire dans une conduite,

- 6 -

La vitesse de circulation du fluide est beaucoup plus importante au centre de la conduite, qu'à proximité de sa bordure. Ce principe sera avantageusement mis en application dans le procédé de la présente invention lors du prélèvement pour obtenir une distribution du liquide prélevé telle qu'illustrée à la figure 3.

On règle le régime d'aspiration du diluteur et donc dans l'aiguille 11 de telle sorte que l'écoulement du liquide dans l'aiguille 11 se fasse en régime laminaire. Dans ce cas, on retrouve une distribution de la solution bactérienne prélevée 1 en forme de cône très effilé dans l'aiguille 11, le cône étant enveloppé par la solution de dilution 15 qui était présente dans l'aiguille avant le prélèvement. La contamination de la paroi intérieure de l'aiguille 11 est ainsi localisée dans sa partie inférieure puisque, sur toute la hauteur, en forme de cône de la solution bactérienne prélevée, celle-ci n'est pas en contact avec la paroi qui est protégée par le liquide dilution qui forme un écran et évite ainsi toute contamination de la paroi intérieure de l'aiguille 11.

Le prélèvement du liquide bactérien selon un écoulement laminaire dans l'aiguille minimise la contamination interne de l'aiguille et donc facilite la stérilisation en réduisant le temps de pénétration de l'aiguille dans le four puisque seule la partie inférieure de l'aiguille doit être stérilisée et donc l'évaporation du contenu de l'aiguille est limitée.

Par contre, durant l'injection du prélèvement additionné du liquide de dilution dans l'éprouvette secondaire pour obtenir une solution diluée, l'écoulement dans l'aiguille sera avantageusement réalisé selon un régime d'écoulement turbulent dans l'aiguille afin de nettoyer les parois de l'aiguille et en particulier la partie inférieure afin de rejeter le maximum de bactéries.

Il est en effet connu que, dans les écoulements turbulents, la couche limite de liquide en contact avec les parois est de très faible épaisseur.

La figure 4 montre un mode de réalisation préférentiel du four 17. Celui-ci est de forme cylindrique et dispose d'une ouverture centrale 18 par laquelle on introduit l'aiguille 11 à stériliser. La hauteur du four 17 sera au moins supérieure à la hauteur de l'aiguille qui doit être stérilisée.

Le four 17 présente un corps annulaire 19 en fibre de céra-

- 7 -

mique autour duquel on a disposé un écran 20 de protection. Le conduit central est bordé par un tube de quartz 21 autour duquel a été bobiné un fil résistant 22 qui assure le chauffage du four. Un dispositif de détection à infrarouge 23 mesure le rayonnement du fil résistant 22 et régule la température du four de façon à ce que celle-ci soit adaptée à une bonne stérilisation, généralement, la température intérieure du four sera supérieure à 1.000 °C. La stérilisation pourra être réalisée en quelques secondes.

Dans le cas de certaines bactéries thermophiles très résistantes à la chaleur, il sera nécessaire de procéder à une vidange de l'aiguille préalablement à son introduction dans le four. La vidange pourra être réalisée très simplement en introduisant un gaz, par exemple, de l'air à la partie supérieure de l'aiguille qui se videra ainsi de son contenu. L'aiguille vidée présente une inertie thermique beaucoup plus faible et réduit ainsi le temps de séjour dans le four.

En ce qui concerne le dispositif de mise en oeuvre de l'invention, les figures 5 et 6 en montrent une réalisation préférentielle entièrement automatisée.

La figure 5 représente le dispositif d'articulation de la potence 24 qui supporte l'aiguille 11. La potence 24 pourra être déplacée verticalement à l'aide d'un chariot 25 motorisé. La potence 24 pourra également être entraînée selon un mouvement rotatif à l'aide d'un moteur 26 qui fera pivoter l'aiguille 11 autour de l'axe 27.

La figure 6 représente, en vue de dessus, un collecteur de fraction 28 équipé, dans son centre, d'un bras de prélèvement 29 tel qu'illustré à la figure 5. Les éprouvettes formant un ensemble dans lequel seront opérées les différentes dilutions successives sont regroupées dans des racks 30, ces racks sont animés d'un mouvement général tournant autour du bras de prélèvement 30.

Le dispositif de dilution effectue un prélèvement dans la première éprouvette 31 et effectue des dilutions successives dans les éprouvettes 32 suivantes. Un module de détection 33 informe l'unité de commande de la présence des éprouvettes 32 de dilution pour que l'opération soit effectuée. Lorsque le module de détection n'enregistre plus la présence d'une éprouvette de dilution 32, il commande alors l'évacuation du rack 30 et effectue une dilution des éprouvettes contenues dans le rack 34 suivant qui est amené en position.

En ce qui concerne le dispositif de mise en oeuvre de la

présente invention, et plus particulièrement l'aiguille, un certain nombre de caractéristiques de construction seront avantageusement adoptées. En particulier, dans le dimensionnement de l'aiguille, celle-ci disposera d'un volume intérieur apte à contenir la quantité de liquide prélevé, sachant que celle-ci présentera une forme conique élancée dans l'intérieur de l'aiguille. L'aiguille aura avantageusement un diamètre de 3 à 4 mm et disposera d'une longueur suffisante pour contenir 2 à 3 fois le volume d'échantillon prélevé. Le régime laminaire de l'écoulement à l'aspiration dans l'aiguille sera réalisé de telle sorte que le nombre de reynolds soit inférieur à 2.000.

Afin de minimiser les turbulences à l'intérieur de l'aiguille lors de l'aspiration, la section intérieure sera sensiblement constante au moins sur la longueur de l'aiguille et ne présentera aucune aspérité.

Afin que toutes les opérations soient effectuées en milieu stérile, le dispositif de l'invention sera avantageusement recouvert par un capot, par exemple en plexiglass pour s'isoler des bactéries de l'air.

Chaque éprouvette sera fermée par un opercule qui isolera son contenu de l'air ambiant, l'aiguille lui transpercera l'opercule lors des prélèvements mais cet opercule présentera des qualités élastiques qui lui permettront de se refermer étanche après que l'aiguille ait été retirée.

D'autres mises en oeuvre de la présente invention, à la portée de l'Homme de l'Art, pourront être adoptées sans pour autant sortir du cadre de celle-ci.

En particulier, diverses expériences ont montré que quelque soit le type d'écoulement utilisé lors de l'aspiration ou du refoulement du liquide présent dans l'aiguille, on peut localiser la contamination dans la partie inférieure de l'aiguille en établissant un régime d'aspiration dans l'aiguille tel que la couche limite résultante soit supérieure à celle produite lors de l'éjection de ce même liquide.

Ainsi, le volume de liquide proche de la paroi interne de l'aiguille et qui a été aspiré est chassé lors du refoulement et ne peut contaminer l'aiguille au moins dans sa partie supérieure.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dilutions stériles successives pour culture bactérienne dans lequel on prélève une certaine quantité (2) de liquide d'un milieu bactérien primaire (1) à l'aide d'une aiguille (11) reliée à un diluteur (12), on injecte la quantité prélevée (2) additionnée d'un
5 liquide de dilution (4) dans une éprouvette secondaire (3), caractérisé en ce que l'on effectue le prélèvement en localisant la contamination de l'aiguille (11) de préférence sur une faible longueur de celle-ci, on stérilise la partie contaminée de l'aiguille (11) avant de la réutiliser pour prélever un échantillon de liquide (6) dans l'éprouvette secondaire
10 (3) et l'injecter dans une éprouvette tertiaire (7) avec une addition de liquide de dilution (8).

2. Procédé de dilutions selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on prélève la solution bactérienne selon une aspiration dans l'aiguille (11) telle que la couche limite sur les parois internes
15 de l'aiguille soit plus épaisse que celle résultante lors de l'éjection.

3. Procédé de dilutions selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on prélève, dans la solution bactérienne (1), un échantillon (2) selon un écoulement laminaire dans l'aiguille (11).

4. Procédé de dilutions selon la revendication 1, caractérisé
20 en ce que l'on injecte dans l'éprouvette (3) l'échantillon (2) de liquide prélevé additionné de liquide de dilution (4) sous un régime d'écoulement turbulent dans l'aiguille (11).

5. Procédé de dilutions selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on stérilise l'aiguille (11) en introduisant son extrémité
25 contaminée dans un four (17) ou tout autre moyen stérilisant.

6. Procédé de dilutions selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on rince la partie interne de l'aiguille en éjectant une certaine quantité de liquide de dilution (15).

7. Procédé de dilutions selon la revendication 5, caractérisé
30 en ce que l'on purge l'aiguille (11) de son contenu en introduisant un gaz à sa partie supérieure.

8. Dispositif de dilutions stériles destiné à la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1, comprenant une série d'au moins deux éprouvettes dans lesquelles doivent être effectuées les dilutions suc-
35 cessives d'un liquide bactérien primaire contenu dans la première éprouvette, une aiguille (11) manipulée par un bras (29) articulé et reliée à un diluteur (12), caractérisé par le fait que le volume intérieur de

l'aiguille (11) est apte à contenir le volume total de la quantité de liquide prélevé (2).

9. Dispositif de mise en oeuvre du procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'aiguille est de section intérieure sensiblement constante sur sa longueur.

10. Dispositif de mise en oeuvre du procédé selon la revendication 8, doté d'un four (17) de stérilisation de l'aiguille (11), caractérisé par le fait que la partie de l'aiguille (11) placée dans le four (17) est au moins égale à celle qui a été introduite dans l'éprouvette.

FIG 1

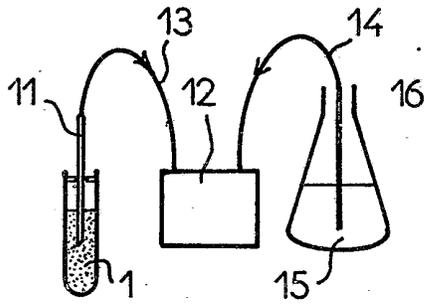
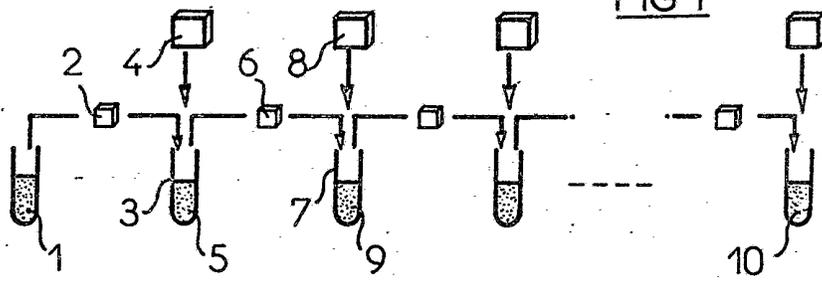


FIG 2a

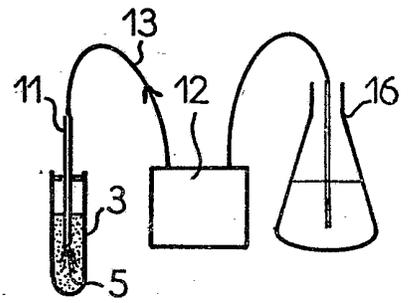


FIG 2b

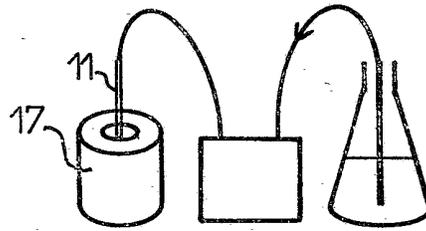


FIG 2c

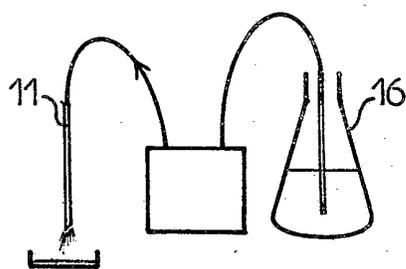


FIG 2d

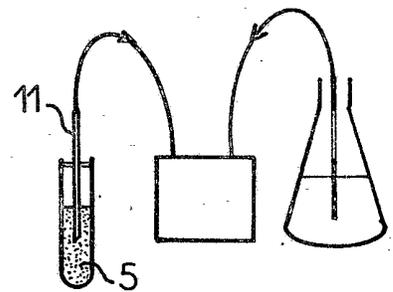


FIG 2e

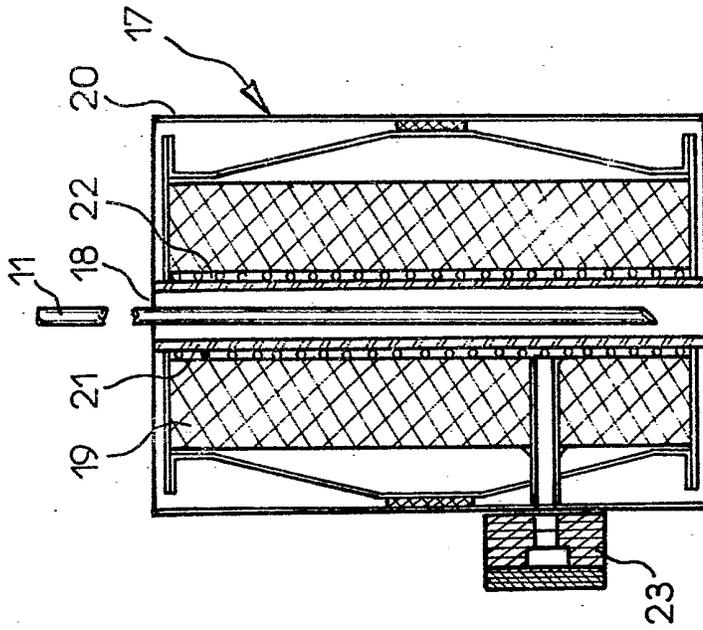


FIG 4

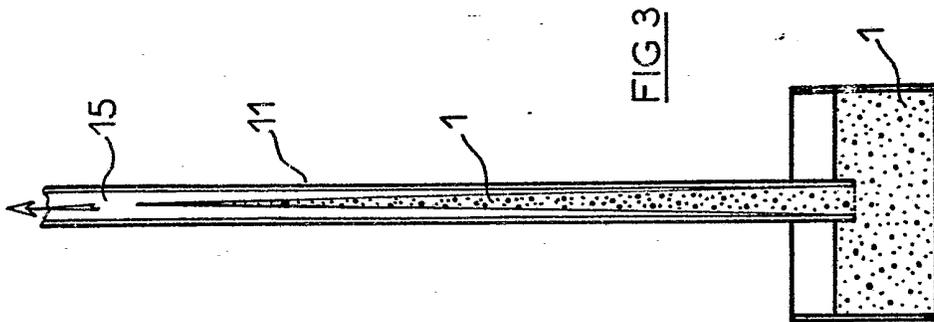


FIG 3

P. 2, III/3

FIG 6

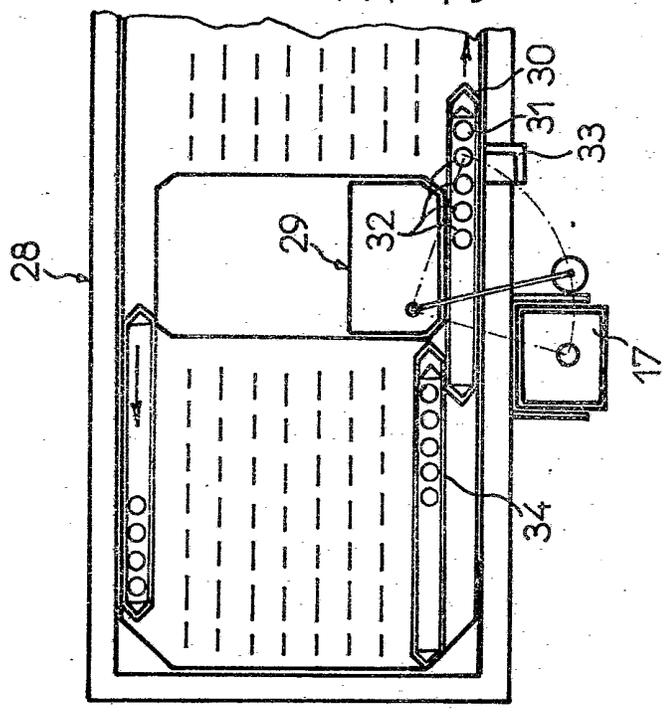


FIG 5

