



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> : <b>G01N 33/53, 33/48</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 88/ 04051</b> (43) Date de publication internationale: 2 juin 1988 (02.06.88)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR87/00468 (22) Date de dépôt international: 25 novembre 1987 (25.11.87) (31) Numéro de la demande prioritaire: 86/16407 (32) Date de priorité: 25 novembre 1986 (25.11.86) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE FRANÇOIS RABELAIS [FR/FR]; 2 bis, boulevard Tonnellé, F-37032 Tours Cédex (FR). CENTRE HOSPITALIER REGIONAL DE TOURS [FR/FR]; 2, boulevard Tonnellé, F-37044 Tours Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : WANG, Zhao, Qiu [CN/FR]; Cité Universitaire du Sanitas, 2, boulevard de Lattre-de-Tassigny, F-37041 Tours Cédex (FR). PATAT, Frédéric [FR/FR]; 2, allée Léonard-de-Vinci, F-37170 Chambray-les-Tours (FR). ROPARS, Claude [FR/FR];</p>		<p>16, rue de la Pinterie, F-37170 Saint-Avertin (FR). POURCELOT, Léandre, Georges [FR/FR]; 14, rue G. Guynemer, F-37170 Saint-Avertin (FR). (74) Mandataire: NETTER, André; Cabinet Netter, 40, rue Vignon, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: BIOLOGICAL TREATMENT METHOD BY USING ULTRASOUND, PARTICULARLY FOR IMMUNO-HEMATOLOGICAL TESTS</p>		
<p>(54) Titre: PROCÉDE DE TRAITEMENT BIOLOGIQUE PAR ULTRASONS, NOTAMMENT POUR TESTS IMMUNO-HEMATOLOGIQUES</p>		
<p>(57) Abstract  A microtitration plate (21) is immersed into a liquid (29) contained in a container (20). A high frequency generator (23) energizes a transducer (24) of which the ultrasound radiation is reflected by a movable reflector (25) to the rows of capsules (22-i) provided on the microplate (21). With a ultrasound frequency of the order of one Megahertz, there is a considerable acceleration of the aggregation effects on suspended particles by fixation of the antigen to the antibody searched for in immunological tests.</p>		
<p>(57) Abrégé  Une plaquette de microtitration (21) est immergée dans un liquide (29) contenu dans un récipient (20). Un générateur haute fréquence (23) excite un transducteur (24), dont le rayonnement ultrasonore est renvoyé par un réflecteur mobile (25) sur les rangées de capsules (22-i) que comporte la microplaquette (21). Avec une fréquence ultrasonore de l'ordre du Mégahertz, on accélère considérablement les effets d'agrégation des particules en suspension par liaison antigène, anticorps recherché dans les tests immunologiques.</p>		

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Procédé de traitement biologique par ultrasons, notamment pour tests immuno-hématologiques.

L'invention concerne les traitements biologiques, et notamment les tests immuno-hématologiques.

5 L'agglutination, technique de base en immunologie, est un phénomène complexe conduisant à la réunion en amas de cellules telles que les globules rouges ou les bactéries ou encore de virus. On peut aussi utiliser des particules autres que vivantes, l'exemple le plus connu étant celui des microbilles de latex, ou des particules de charbon.

10

Ces particules sont en suspension dans un milieu liquide biologique, qui peut être défini comme comprenant de l'eau associée à un électrolyte tampon convenable (sérum physiologique), et contenant en solution des protéines.

15

Un test immunologique fait aussi intervenir des antigènes (ou sites antigéniques) et des anticorps. Les antigènes peuvent être les éléments en suspension eux-mêmes, auquel cas les anticorps sont présents en solution dans le milieu  
20 liquide. Inversement, les anticorps peuvent être portés par les particules en suspension, les antigènes étant alors en solution.

Matériellement, le liquide biologique à tester est contenu dans des récipients qui sont parfois encore des tubes à essais, ou, mieux, une plaque de microtitration, définissant un réseau bidimensionnel de capsules propres à recevoir chacune un échantillon.

La réponse au test dépend essentiellement de la répartition de la densité optique existant dans chaque capsule, au bout d'un temps plus ou moins long, selon la réaction. On sait faire une mesure automatique de cette image. On sait de même automatiser certaines des phases de préparation des tests immunologiques.

La phase d'agglutination proprement dite, peut être conduite en recourant à des artifices de milieu, comme des enzymes, macromolécules, polycations, antiglobulines, ou autres. Actuellement, on peut soit laisser sédimenter les hématies (ou autres) sous l'effet de la gravitation, soit centrifuger la plaque de micro-titration.

La technique de sédimentation libre demande un temps assez long, que l'on a pu réduire un peu en utilisant des plaques à capsules en forme d'escalier (OLYMPUS).

La centrifugation des plaquettes de microtitration accélère davantage la réaction ; cependant, l'effet de centrifugation provoque une sédimentation systématique des hématies - agglutinées ou non - au fond des capsules. On peut alors recourir à différentes techniques complémentaires, qui prennent du temps : inclinaison des plaques à température un peu plus élevée, ou bien remise en suspension des hématies libres, par exemple par agitations successives à vitesse lente. Ces techniques, délicates à mettre en oeuvre, ne sont guère automatisables.

De plus, elles sont de nature à introduire une perte de sensibilité, notamment lorsqu'on centrifuge un milieu qui

est le siège d'une faible réaction, où les agglutinats sont petits.

Le temps de sédimentation et donc de formation de l'image,  
5 limite donc les performances des appareils de test actuellement utilisés.

La présente invention vient améliorer la situation.

10 Un premier but de l'invention est de permettre d'accélérer et/ou d'amplifier l'agglutination.

Un autre but de l'invention est d'accélérer en outre la  
sédimentation, pour éviter le recours à la centrifugation,  
15 autant que possible.

L'invention a encore pour but de permettre la remise en  
suspension d'hématies (ou autres), par des moyens simples  
et automatisables, dans les cas où une telle opération est  
20 nécessaire.

L'invention fait intervenir à cet effet des ultrasons, d'une  
manière particulière.

25 L'usage d'ultrasons en milieu vivant a déjà fait l'objet de plusieurs observations.

La formation d'amas de globules rouges, toutes les demi-  
longueurs d'onde, dans un embryon de poulet vivant, a été  
30 constatée dans l'article : "A microscope viewing ultrasonic  
irradiation chamber", J.B. POND, B. WOODWARD et MARY DYSON,  
Phys. Med. Biol., 1971, Vol. 16, N° 3, pp 521-524. Une simulation  
numérique de la formation des amas a été proposée  
ultérieurement : "Blood cell banding in ultrasonic standing  
35 wave fields : a physical analysis" GAIL TER HÅAR et S.J.  
WYARD, Ultrasound in Med. & Biol., Vol. 4, pp 111, 123,  
Pergamon Press, 1978.

Ces publications prennent en compte :

- la force dite "pression de radiation", connue depuis longtemps, du moins lorsqu'il s'agit de l'effet d'une onde acoustique stationnaire sur une sphère en milieu non visqueux ;
- l'effet de viscosité ("viscous drag") ;
- les forces interparticulaires, qui existent lorsque plusieurs corps voisins sont soumis au champ ultrasonore stationnaire ; et
- des effets secondaires dus à la présence de bulles de gaz, aux distorsions subies par l'onde acoustique (forces d'Oosen, ou "Oosen-type forces"), ainsi qu'aux variations de la viscosité en fonctions de la température.

Plus récemment, l'Article "Interparticle forces on red blood cells in a standing wave field" M.A.H. WEISER et R.E. APFEL, *Acustica* 56 (2), pp 114-128, 1984, a proposé une analyse de la force intercellulaire dans un champ d'ondes acoustiques stationnaires, et en a déduit la position d'équilibre de deux hématies pour une fréquence acoustique déterminée.

Cependant ces calculs ne sont valides que dans le cas de distances interparticulaires élevées.

L'observation de POND, WOODWARD et DYSON, et les analyses qu'elle a suscitées, concernent des expérimentations in vivo.

A côté de cela, une observation in vitro a été rendue publique : "Segregation and sedimentation of red blood cells in ultrasonic standing waves", N. VASHON BAKER, *Nature* 239, oct(13), 1972, pp 398-399. L'auteur constate que, dans des récipients de polystyrène contenant du sang complet ou des cultures de celui-ci, la sédimentation naturelle des hématies est grandement accélérée, sous un champ acoustique de  $3W/cm^2$  à 1MHz. Sont également relevés d'une part l'in-

fluence de la densité en globules rouges de la suspension, d'autre part le fait que la sédimentation accélérée n'est observée que lorsque le champ acoustique se propage horizontalement (ségrégation selon des bandes de sédimentation verticales). N.V. BAKER en tire que la ségrégation n'est pas due à des forces de Bernouilli, comme suggéré par POND, WOODWARD et DYSON, mais plutôt à des courants de convection provoqués par la variation périodique de la densité des suspensions cellulaires.

10

La présente invention a pour point de départ des observations d'une autre nature.

Les particules en suspension dans un milieu liquide se chargent électriquement.

15

Les forces élémentaires qui entrent en jeu sont :

- la répulsion électrostatique due à la double couche électrique ; et

20

- l'attraction de type LONDON - VAN DER WAALS.

Dans l'exemple du sang humain, ces forces ont pour effet que les globules rouges s'agrègent, en présence de pontages macromoléculaires, à la façon de "piles d'assiettes".

25

De son côté, l'agglutination des hématies (ou érythrocytes) intervient lorsque la suspension permet une fixation d'anticorps sur des structures antigéniques.

30

Il a maintenant été constaté que, compte-tenu des propriétés électriques et physicochimiques des globules rouges, les réactions d'agglutination érythrocytaire sont substantiellement améliorées sous l'effet des ultrasons.

35

L'invention s'applique tout d'abord à un procédé de traitement biologique, dans lequel on place dans un récipient

un milieu liquide biologique contenant des particules en suspension, ce milieu et ces particules étant associées l'un à des anticorps, l'autre à des antigènes, de sorte qu'une réaction immunologique peut s'établir entre les anti-  
5 corps et les antigènes et conduire éventuellement à une agglutination des particules. Selon l'invention, on applique au milieu liquide un faisceau cohérent d'ultrasons, à une fréquence comprise entre 0,1 et 100 MHz, de préférence comprise entre 0,5 et 20 MHz, environ, capable de produire des forces  
10 de radiation favorisant le regroupement de ces particules.

On peut ainsi utiliser ces forces de radiation pour favoriser une réaction d'agglutination des particules ou encore pour favoriser l'échange du milieu liquide biologique, à  
15 des fins de lavage, les particules étant regroupées.

La densité de puissance du faisceau d'ultrasons peut aller de 0,1 à 100 W/cm<sup>2</sup>, de préférence de 0,5 à 20 W/cm<sup>2</sup>, environ.  
20

Pratiquement, le récipient (tube à essais, ou mieux, plaque de microtitration) est mis extérieurement au contact d'un milieu de transfert d'ultrasons, en principe d'un liquide tel que de l'eau. En variante on peut utiliser, comme milieu  
25 de transfert, un milieu souple tel qu'un matériau à base de silicone.

Avantageusement, la direction du champ ultrasonore dans le récipient est sensiblement alignée sur la verticale de  
30 celui-ci.

Plus restrictivement, le milieu liquide est de l'eau associée à un tampon de pH et contenant des protéines en solution, et les particules sont des cellules ou des microparti-  
35 cules propres à former substrat de réaction.

Dans une application particulière, le milieu liquide est une solution d'hématies à faible concentration.



Dans une autre application, les particules sont des micro-particules de latex.

5 Selon un aspect de l'invention, le faisceau d'ultrasons est appliqué de manière à établir un régime sensiblement stationnaire dans une direction de l'espace, mais de façon non uniforme, ou non continue (dans l'espace et/ou dans le temps).

10 En d'autres termes, il doit s'agir d'un champ acoustique "non progressif", c'est-à-dire qui ne se propage pas indéfiniment. Quoique les modes propres en soient très difficiles à définir, le récipient va constituer une sorte de cavité résonante pour les ultrasons.

15 Quant à la cohérence du champ acoustique, elle peut être définie comme suit : le temps de cohérence du champ acoustique doit être supérieur au temps d'aller-retour des ondes dans le récipient.

20 Il est possible d'opérer par interruptions répétées du champ acoustique.

Pendant l'application du champ, les hématies s'agrègent  
25 en paquets, piégés dans les ventres de vibration, et qui sont le siège de la réaction d'agglutination. Lorsque ces paquets atteignent une certaine taille critique, ils tombent ou sédimentent, créant un culot au fond du récipient. A ce moment, l'application du champ acoustique peut être  
30 interrompue.

Or, le culot comporte des hématies agglutinées (réaction  
pratiquement irréversible) en même temps que des hématies  
35 simplement agrégées (réaction sensiblement réversible).

Une autre façon d'opérer, particulièrement intéressante, consiste à wobuler légèrement la fréquence du champ acoustique.

De préférence, cette wobulation est conduite de manière à faire descendre lentement les ventres de vibration vers le fond du récipient. Elle peut aussi être déplacée en sens inverse, si l'on veut réaliser une remise en suspension  
5 des hématies, agglutinées ou non.

L'homme de l'art comprendra qu'il faut donc choisir l'amplitude et la vitesse de cette wobulation en fonction de la rapidité de la ou des réactions d'agglutination en présence desquelles on se trouve.  
10

Une autre constatation très importante a été faite : l'invention permet d'accélérer les réactions d'agglutination, sans en altérer les résultats. Les réactifs et les modes  
15 opératoires utilisés jusqu'à présent peuvent donc être conservés.

Il semble par contre que la sensibilité des tests soit augmentée, en particulier pour les réactions d'agglutination  
20 faibles.

Un autre aspect de l'invention concerne précisément de telles réactions faibles.

25 Les techniques actuelles utilisent la centrifugation pour accélérer la sédimentation. La mise en oeuvre de cette centrifugation est en elle-même délicate ; il faut notamment un rayon de gyration important, pour que la centrifugation produise des effets homogènes sur tous les récipients (tubes  
30 ou capsules de microplaques).

Mais la centrifugation sédimente toutes les hématies, agrégées ou agglutinées. Une remise en solution des hématies agrégées - opération elle aussi très délicate - est donc  
35 nécessaire.

L'invention permet aussi d'effectuer par ultrasons cette remise en solution.

Bien qu'on puisse utiliser à cet effet le même type de champ acoustique que précédemment, il semble actuellement préférable que le faisceau d'ultrasons soit focalisé, sur le milieu liquide contenu dans le récipient.

5

Ainsi, l'invention permet dans la plupart des cas d'éviter la centrifugation. Mais, lorsque celle-ci demeure nécessaire, la remise en solution peut être obtenue d'une manière simple par ultrasons, en évitant de briser les petits agrégats.

10

Certains procédés immuno-hématologiques, comme le test de COOMBS (réaction amplifiée par antiglobulines) nécessitent un ou plusieurs lavages de la suspension d'hématies. Un lavage classique comprend les étapes suivantes : centrifugation, aspiration du surnageant, redistribution du liquide laveur, remise en suspension.

Des ultrasons de basse fréquence ont déjà été utilisés pour l'homogénéisation et la dispersion de suspensions. Mais l'effet obtenu est accompagné de cavitation, qui provoque la destruction (lyse) d'une partie des cellules.

Il a été découvert qu'avec un faisceau ultrasonore selon l'invention (typiquement, fréquence de 1 à 10 MHz), les globules rouges sont remises quasi-instantanément en suspension sans effet de lyse à la cavitation.

Ceci ouvre la voie à une automatisation complète des tests nécessitant des lavages, comme le test de COOMBS, (réaction de COOMBS indirecte) dont on connaît l'intérêt pour la détermination des incompatibilités Rhésus foeto-maternelles ou autres réactions immuno-hématologiques.

L'invention concerne également une installation de traitement biologique, qui comporte une cellule à ultrasons, propre à appliquer un faisceau cohérent d'ultrasons, de fréquence comprise entre 0,1 et 100 MHz, à au moins un récipient contenant un milieu liquide biologique avec des par-

ticules en suspension, le faisceau étant capable de produire des forces de radiation favorisant le regroupement de ces particules.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à l'examen de la description détaillée ci-après, et des dessins annexés, sur lesquels :

10 - la figure 1 est un schéma fonctionnel rappelant les différentes phases d'un test d'immuno-hématologie ;

- la figure 1A est un schéma fonctionnel semblable à la figure 1, pour le cas où la mise en oeuvre du test nécessite une centrifugation ;

15

- la figure 2A est un schéma simplifié, en coupe, d'un premier dispositif expérimental pour la mise en oeuvre de l'invention ;

20 - la figure 2B est un schéma simplifié, également en coupe, d'un second dispositif pour la mise en oeuvre de l'invention ;

25 - la figure 3 est un diagramme temporel montrant un signal wobulé en fonction du temps ;

- les figures 3A et 3B sont des diagrammes spatiaux montrant l'effet de la wobulation de la figure 3 ;

30 - la figure 4 est un schéma simplifié, en coupe, d'un autre dispositif pour la mise en oeuvre de l'invention ;

35 - la figure 5 est un schéma simplifié, également en coupe, d'encore un autre dispositif expérimental pour la mise en oeuvre de l'invention ; et

- la figure 6 est un schéma simplifié, en coupe, d'une variante du dispositif expérimental de la figure 5.

Comme déjà relevé, l'invention peut s'appliquer à différents types de suspensions biologiques, dans lesquelles les éléments en suspension peuvent être des éléments vivants, tels que des globules rouges, des bactéries ou des virus, ou bien des particules inertes telles que des microbilles de latex ou de charbon. Sauf mention contraire, la présente description détaillée concerne le cas où les éléments en suspension sont des globules rouges ou hématies.

Par ailleurs, les tests immunologiques peuvent être conduits avec pour récipients des tubes à essais. On supposera maintenant qu'il s'agit de plaquettes de microtitration, que l'on appellera plus brièvement "microplaques". Un modèle courant de microplaques comporte 8 x 12, soit 96 récipients élémentaires, que l'on appelle aussi capsules. On pourrait aussi utiliser tout autre récipient comprenant une multiplicité de capsules ou d'alvéoles disposées suivant un réseau bidimensionnel.

Dans un test immuno-hématologique ordinaire, la première étape 11 (figures 1 et 1A) consiste en le remplissage automatique des microplaques, qui comprend :

- la distribution de l'échantillon dans chaque capsule ;
- la dilution de l'échantillon dans chaque capsule, par addition d'un agent de dilution convenable, comme du sérum physiologique ;
- la distribution du ou des réactifs en quantité contrôlée dans les différentes capsules.

Maintenant, un distributeur à microseringue peut, en moins d'une minute, assurer la dilution et la répartition des réactifs dans les 96 capsules de la microplaque.

L'étape suivante 12 est l'incubation, durant laquelle se produit ou non la réaction d'agglutination.

Lorsque la réaction impliquée est une réaction forte, soit par elle-même, soit par le fait qu'on utilise des artifices de milieu (enzymes, macromolécules, polycations, antiglobulines, par exemple), on peut se contenter de laisser sédimenter simplement les hématies, sous l'effet de la gravitation, comme illustré par l'étape 17 de la figure 1.

Cette technique dite de sédimentation libre demande un temps assez long, qui dépasse couramment la demi-heure. Ordinairement, la mesure quantitative de l'agglutination se fait avec des microplaques dont le fond est en U ou V. Avec un nouveau type de microplaques, dont les capsules ont un fond en forme d'escalier, la société OLYMPUS a permis de réduire un peu le temps de sédimentation, qui descend à 20 minutes environ.

On procède ensuite à la lecture des résultats, en l'étape 18. S'il y a agglutination, un culot de sédimentation est présent au fond de la capsule. Dans le cas contraire, celle-ci est recouverte d'une manière uniforme. L'acquisition des mesures peut donc être automatisée, puisqu'il s'agit a priori d'une mesure de densité optique à travers la capsule en différents points.

Ensuite, en général à l'aide d'un micro-ordinateur, on procède à un traitement des mesures et à une présentation des résultats. Il faut en effet tenir compte des cas où le résultat n'est pas clair, ainsi que des conditions particulières propres à chaque test.

La figure 1A concerne le cas d'une réaction d'agglutination lente, ou faible. Après l'incubation, ou pendant celle-ci, on procède habituellement à une centrifugation 13, qui accélère la réaction, en concentrant toutes les hématies, agglutinées ou non, au fond des capsules. Bien entendu, des étapes supplémentaires sont nécessaires pour effectuer la lecture de l'image.

Une première façon de procéder consiste à incliner les microplaques selon un angle d'environ  $75^\circ$  par rapport à l'horizontale, pendant un temps d'environ 5 minutes, afin d'observer des différentes images qui permettent de quantifier l'agglutination. Ce procédé est délicat à mettre en oeuvre, surtout lorsque l'automatisation complète est désirée.

Une autre façon de procéder consiste à effectuer des agitations successives des microplaques, à vitesse lente, pour remettre en suspension les hématies libres, c'est-à-dire celles qui ont été sédimentées, mais ne sont pas agglutinées. Là encore, la manipulation est délicate, et on observe souvent une perte de sensibilité due à l'agitation, dans le cas où la réaction est faible, et où par conséquent les agglutinats sont petits. De plus, ce procédé est lui aussi difficilement automatisable, car il nécessite une manipulation des microplaques.

Ensuite, les lectures de densité optique et le traitement des résultats peut s'effectuer selon des étapes 18 et 19 semblables à celles de la figure 1.

Il est maintenant fait référence à la figure 2A. On y voit une microplaque 21, montée en partie supérieure d'un récipient 20 rempli d'un liquide 29 tel que de l'eau. Un générateur haute fréquence 23 excite un transducteur ultrasonore 24, qui applique un champ acoustique vers un réflecteur 25 positionné pour renvoyer ce champ vers la rangée de capsules 22i de la microplaque 21. Comme illustré par la flèche 26, le réflecteur 25 peut être déplacé, de façon à permettre l'insonification de l'une quelconque des rangées de capsules 22-1 à 22-n que comporte la microplaque 21.

Une variante de ce dispositif est illustrée sur la figure 2B. On y voit un générateur haute fréquence 23 qui alimente une série de transducteurs 24-1 à 24-n, insonifiant chacun une rangée 22-1 à 22-n des capsules de la microplaque 21.

La microplaque peut être incorporée dans la cellule à ultrasons ainsi constituée sans aucune modification. Son déplacement entre l'automate de remplissage et le lecteur d'images peut être assuré à l'aide d'un tapis roulant, contrôlé par un programme prédéterminé. Dans la cellule à ultrasons, le ou les transducteurs 24 et éventuellement le réflecteur 25 sont immergés dans le liquide 29, tandis que la microplaque 21 est maintenue à la surface du liquide. Le liquide 29 assure la propagation des ondes ultrasonores dans les capsules de la microplaque 21. L'interface liquide air, tant dans la microcapsule que pour le liquide 29, sert de réflecteur presque parfait pour établir un champ ultrasonore stationnaire.

Les figures 2A et 2B ont montré que le générateur d'ultrasons peut être constitué soit de couples (éléments piézo-électriques/réflecteur) associés à un moteur pour assurer l'insonification de chaque cellule, soit d'une batterie d'éléments piézo-électriques qui assure cette insonification d'une manière directe, et simultanément, pour chaque cellule.

Une focalisation et/ou une orientation électronique du faisceau peuvent être réalisées, à partir d'une matrice de transducteurs.

Bien qu'une fourchette de fréquence plus large puisse être mise en oeuvre, il est préféré que la fréquence des ultrasons soit comprise entre 0,5 et 20 MHz, environ. Dans la plupart des cas, cette fréquence sera comprise entre 1 et 10 MHz. Le choix de la fréquence dépend du type de réaction, ainsi que de l'impédance acoustique et de l'épaisseur de la microplaque.

La puissance surfacique du faisceau d'ultrasons peut varier en de larges limites suivant les applications. Elle sera de préférence, au niveau des transducteurs, de 0,5 à 20 watts/centimètre carré, le plus souvent d'environ 1 à 5



watts/centimètre carré.

Le générateur 23 va produire soit un signal monochromatique, continu ou intermittent, soit un signal à fréquence wobulée.

5

Une excitation monochromatique permet une agglomération rapide des amas de particules, en deux bandes séparées chacune d'une demi-longueur d'onde. L'arrêt de l'émission acoustique provoque une sédimentation rapide par simple gravitation, car la vitesse de sédimentation est d'autant plus grande que la taille des particules est plus importante.

On comprendra plus loin que l'excitation monochromatique intermittente est intéressante pour certaines applications. La raison en est qu'elle permet d'obtenir des effets de remise en suspension d'hématies sédimentées mais non agglutinées, qui peuvent alors à nouveau réagir, et s'agglutiner, à nouveau d'une manière accélérée, compte tenu de l'application d'ultrasons.

20

Par ailleurs, dans ce qui précède, le champ ultrasonore appliqué aux capsules est vertical. Avec un champ vertical, il apparaît préférable que l'insonification soit intermittente.

25

Si l'on pouvait utiliser un champ ultrasonore horizontal pour des tests à microplaques, alors l'insonification pourrait plus aisément être rendue continue.

30 La figure 3 montre une variante très intéressante de l'invention. Cette variante fait usage d'une wobulation descendante de fréquence. Plus précisément, la fréquence d'excitation varie de  $f_2$  à  $f_1$ , de façon symétrique autour d'une valeur centrale  $f_0$ , et ce avec une période de répétition,  $T_r$ . Cette wobulation descendante de fréquence permet de déplacer les noeuds et les ventres du champ ultrasonore et par conséquent les amas d'hématies vers le fond des capsules. Cela est illustré schématiquement sur les figures

35

3A et 3B, où l'on voit que le dernier noeud, qui est en position A sur la figure 3A, descend en position B au fond de la capsule sur la figure 3B, lorsqu'on passe du temps  $t_0$  au temps  $t_0+T_r$ .

5

Ceci accélère de façon très notable la sédimentation spontanée dans la microplaque.

10 Il semble de plus qu'en choisissant convenablement la fréquence de répétition  $Fr = 1/T_r$ , on puisse réaliser une sédimentation différentielle, c'est-à-dire que des particules de tailles différentes vont se sédimenter à des vitesses différentes.

15 L'amplitude de wobulation, c'est-à-dire la différence  $f_2-f_1$ , dépend essentiellement du volume de suspension à insonifier, et de la distance entre la sonde ou transducteur ultrasonore 24 et l'interface liquide/air.

20 En pratique, il y aura lieu de déterminer l'intensité acoustique, la fréquence de travail, la fréquence de répétition et le temps d'insonification pour chaque type de réaction.

25 On sait que, compte tenu de la différence que présentent les hématies agglutinées et libres quant à l'adhésion sur une surface, une réaction positive est caractérisée par une image en voile, tandis qu'une réaction négative est caractérisée par un anneau ou un point rond au fond des capsules.

30

Le lecteur d'images va donc analyser les intensités optiques centrales, et un réseau périphérique d'intensité optique, dans chaque capsule. Le rapport de ces intensités permet de classer la réaction en positive, négative ou douteuse.

35

La lecture peut aussi se faire uniquement par un système d'analyse d'image en réseau, intéressant toute la surface

de la capsule. Bien entendu, les valeurs de seuil de ce rapport dépendent du type de réaction concernée, et ces valeurs de seuils sont préalablement inscrites dans le programme d'analyse correspondant.

5

Les moyens de l'invention permettent une accélération substantielle de la réalisation des tests immunologiques, et surtout une automatisation complète de celle-ci.

10 Lorsqu'on sait que le distributeur actuel utilisé pour l'étape 11 permet le remplissage des capsules en moins d'une minute, et que la lecture d'image automatique prend également très peu de temps, il est très intéressant d'utiliser les moyens de l'invention, qui abaissent considérablement  
15 le temps intermédiaire nécessaire pour que la lecture puisse se faire.

On donnera ci-après des exemples de réactions conduites selon l'invention.

20

EXEMPLE 1 (TABLEAU 1)

Cet exemple intéresse un test de groupage sanguin ABO.

25 Les antigènes sont portés par des hématies d'un donneur de groupe A1. La dilution s'effectue à 1 % dans du sérum physiologique (NaCl) à 9 ‰.

L'anticorps est un sérum de test anti-A, tel que fourni  
30 par le Centre National de Transfusion Sanguine.

Les résultats sont montrés dans le Tableau 1 annexé, dans lequel :

35 V désigne la tension d'excitation des transducteurs en volts,

f désigne la fréquence centrale d'excitation en MHz,

$T_1$  indique la durée d'insonification, en secondes,

$T_2$  indique la durée de sédimentation, en secondes et/ou minutes, suivant le cas.

5

Un échantillon de contrôle a été préparé suivant les méthodes de la technique antérieure. Le temps de sédimentation était de 30 minutes. Les résultats ont été fortement positifs ou positifs jusqu'à la dilution 1/128, douteux pour  
10 la dilution 1/256, et négatifs pour les autres dilutions plus faibles.

Deux expériences ont été conduites avec insonification, la durée de sédimentation étant de 12 minutes dans le pre-  
15 mier cas, et de 1 minute 30 secondes dans le second. Les résultats sont les mêmes pour ces deux expérimentations, puisque ces résultats sont fortement positifs jusqu'à la dilution 1/256, douteux pour 1/512, et négatifs pour les dilutions plus faibles.

20

On observe tout d'abord que la durée de sédimentation peut être rendue très faible, puisqu'il n'y a aucune différence après l'insonification entre la sédimentation de 12 minutes et celle de 1'30".

25

On observe aussi que les résultats obtenus avec insonification sont tout à fait cohérents avec ceux que l'on obtenait par les moyens de la technique antérieure.

30 On observe enfin que l'application d'ultrasons confère à la méthode une meilleure sensibilité, puisque l'échantillon douteux à la dilution 1/256 devient maintenant positif, le doute ne subsistant plus qu'à la dilution 1/512.

35 EXEMPLE 2 (TABLEAU 2)

Cet exemple concerne un test relatif à l'hépatite B, dit "recherche AG HBS".

On recherche l'antigène HBS dans le sérum de trois sujets, dénotés respectivement Tra, Nal, Dix.

Les anticorps sont portés par des hématies sensibilisées, ainsi que des anticorps de contrôle, disponibles dans les kits dits Hématest VK01, vendus par la Société américaine Wellcome.

Les paramètres de l'application d'ultrasons sont définis comme précédemment.

Suivant la méthode habituelle dans ce genre de test, chaque échantillon est soumis à l'anticorps de test, puis au réactif de contrôle, et ce d'abord sans ultrasons, ensuite avec ultrasons, comme indiqué dans le Tableau 2.

Pour l'antigène Tra, on observe une réponse négative dans tous les cas, avec ou sans ultrasons.

Pour l'antigène Nal, la réponse est positive pour le test et négative pour le contrôle, avec un temps de sédimentation de 40 minutes.

Le tableau 3 annexé montre que, après l'application d'ultrasons à 3,5 MHz pendant 15 secondes, on peut obtenir le même résultat au bout d'un temps de 2'30" seulement.

En ce qui concerne le troisième échantillon, la méthode classique donnait un résultat positif jusqu'à la dilution 1/128, douteux pour 1/256, et négatif pour 1/512.

Toujours après application d'ultrasons à 3,5 MHz pendant 15 secondes et au bout d'un temps de sédimentation de 2,5 minutes seulement (au lieu de 40 minutes), l'application de l'invention permet d'obtenir exactement le même résultat.

On conçoit immédiatement les avantages pratiques considérables que l'on peut tirer d'une telle rapidité, combinés

avec la possibilité d'automatiser complètement le test.

EXEMPLE 3 (TABLEAU 3)

5 Cet exemple concerne le phénotypage dans les groupes Rhésus RH, et sera décrit en référence au tableau 3.

L'antigène est constitué des hématies d'un donneur référencé D  $\bar{c}$  EE. Ces hématies sont diluées en suspension à 1 %  
10 dans du sérum physiologique NaCl à 9 ‰.

Les anticorps sont les tests sérums Anti  $\bar{c}$ , Anti E et Anti C, vendus par la Société Ortho Diagnostic Systems.

15 Le tableau 3 montre que l'application d'ultrasons à la fréquence de 3,5 MHz pendant 20 secondes permet la lecture au bout de 2 minutes, avec des résultats conformes au phénotype du donneur.

20 Comparativement, cette lecture aurait nécessité 20 minutes, avec les moyens de la technique antérieure.

De par sa grande rapidité, le procédé selon l'invention permet dans beaucoup des cas d'éviter la phase de centri-  
25 fugation, et les complications qui en résultent.

Par ailleurs, il existe des réactions, dont les tests dits à réaction de COOMBS indirecte, qui nécessitent un ou plusieurs lavages de la suspension d'hématies, le lavage clas-  
30 sique comprenant impérativement : la centrifugation, l'aspiration du surnageant, la redistribution du liquide laveur et la remise en suspension.

Lorsque le récipient de test est une microplaque, un tel  
35 lavage demande une manipulation délicate de cette microplaque, aux étapes de centrifugation et d'agitation. Cela empêche l'automatisation du test.

Comme déjà mentionné, on a proposé d'homogénéiser et de disperser des suspensions par ultrasons. Mais cette solution n'est pas utilisables dans la plupart des tests biologiques, car l'effet d'homogénéisation et de dispersion est  
5 lié à la cavitation créée par des ultrasons de basse fréquence, ce qui provoque la destruction d'une partie des cellules.

La présente invention propose d'opérer différemment.

10

Selon l'invention, les capsules de la microplaque sont insonifiées avec un faisceau ultrasonore de fréquence relativement haute, typiquement 1 à 10 MHz. Il a été observé que, dans ces conditions, l'onde ultrasonore ne provoque pas  
15 de cavitation, donc pas d'hémolyse des cellules. A condition de positionner correctement le faisceau ultrasonore, de manière à créer un tourbillon dans les capsules, on observe une remise en suspension quasi-instantanée des globules rouges. Contrairement aux méthodes d'agitation de la  
20 technique antérieure, ce procédé est très rapide, et facilement automatisable.

Ceci peut être mis en oeuvre à l'aide des dispositifs expérimentaux des figures 2A et 2B.

25

Pendant, il sera souvent préférable d'utiliser un faisceau ultrasonore focalisé, comme on le verra maintenant.

Le réflecteur 25 est maintenant sur la figure 4 un réflecteur  
30 concave 25C, qui permet une focalisation du faisceau ultrasonore sur une rangée de capsules, de telle manière que le faisceau soit convergent à l'intérieur de la capsule.

Comme précédemment, on peut insonifier les différentes capsules en déplaçant le réflecteur 25-C suivant la flèche  
35 26.

Une variante consiste aussi à prévoir une batterie de trans-

ducteurs (analogue à celle de la figure 2B), mais agencés soit individuellement, soit en combinaison les uns avec les autres, pour produire en faisceau convergent ou wobulé au niveau de chacune des rangées de capsules.

5

Bien entendu, au lieu de déplacer le réflecteur 25 (figure 2A) ou 25-C (figure 4), on pourra préférer déplacer la plaquette 21 elle-même, remarque étant faite que le dispositif comprendra le plus souvent un tapis roulant pour amener  
10 cette plaquette au niveau de la cellule à ultrasons.

Il a été observé plus haut que l'invention peut être mise en oeuvre soit avec un seul transducteur ultrasonore associé ou non à un réflecteur mobile, soit avec un réseau de  
15 transducteurs ultrasonores, dont chacun est propre à exciter par exemple l'une des capsules de la microplaque.

On a indiqué aussi l'intérêt d'une wobulation de fréquence du signal ultrasonore, qui permet de produire un champ ultrasonore stationnaire cohérent, mais lentement mobile. On  
20 peut aussi obtenir un tel champ ultrasonore stationnaire cohérent et lentement mobile en utilisant deux transducteurs (ou plus), auxquels on fait émettre des signaux qui présentent entre eux un décalage de phase variable avec le temps.  
25 Ceci peut conduire à prévoir plusieurs transducteurs pour chaque capsule.

La fréquence de répétition (de la wobulation, ou bien les décalages de phases variables avec le temps) est avantageusement choisie de telle façon qu'un nouveau cycle de  
30 variations commence lorsque les particules qui étaient situées au premier noeud correspondant à la fréquence de départ de la wobulation sont parvenues au premier ventre correspondant à la fréquence de fin de la wobulation, comme  
35 cela est visible d'après les figures 3A et 3B.

Ainsi, l'invention permet l'hémagglutination automatisée et accélérée en plaques de microtitration, pour les tests



suivants :

- groupage ABO et rhésus,
- 5 - détermination des phénotypes,
- recherche des anticorps irréguliers,
- test d'antigène HB (hépatite B) d'anticorps syphilis et  
10 antitétanique, ou autres anticorps courants,
- réactions d'hémagglutinations passives.

L'invention permet aussi de mettre en oeuvre les tests du  
15 genre Coombs, sans aucune centrifugation ni agitation mécanique.

Par ailleurs, une remise en suspension peut aisément être  
réalisée, en produisant des faisceaux d'ultrasons sphériques,  
20 c'est-à-dire convergents, dirigés vers la paroi des capsules. On obtient ainsi un tourbillon dans les capsules, et une remise en suspension quasi-instantanée des particules libres, c'est-à-dire non agglutinées. L'intérêt est qu'en  
opérant en haute fréquence, l'homogénéisation et la remise  
25 en suspension se font sans cavitation ni destruction des cellules.

Cela est applicable à un procédé de lavage à ultrasons, dans les plaques de microtitration ou en tubes à essais.  
30 Ce lavage est combiné à la sédimentation et à la remise en suspension par ultrasons.

L'automate utile à cet effet consiste en un distributeur, une unité de lavage à ultrasons, et un aspirateur du sur-  
35 nageant.

On aura observé aussi que l'invention permet la sédimentation accélérée de particules de latex ou autres parti-

cules supports utilisables en réaction d'agglutination artificielle, ou bien radio-immunologique, ou bien pour des réactions immuno-enzymatiques.

5 Il est maintenant fait référence aux figures 5 et 6, pour la description de variantes de l'invention. Le récipient 30 est ici constitué d'une cuve, possédant un orifice d'entrée 31 en partie basse, à gauche, pour recevoir par exemple du sang. Cette cuve possède deux orifices de sortie en partie droite, en haut une sortie 32H pour le plasma, et en  
10 bas une sortie 32L pour le culot de sédimentation.

Le long de la paroi de gauche de la cuve 30 est prévu un transducteur ultrasonore 34 excité par un générateur 33.

15 La paroi opposé 35 de la cuve 30 est agencée en réflecteur.

Un champ stationnaire cohérent est ainsi développé à l'intérieur de la cuve 30. Il permet la sédimentation au niveau des ventres 37V du champ ultrasonore. Il en résulte un mouvement de convection, qui se traduit par une remontée aux  
20 emplacements des noeuds 37N du champ ultrasonore.

Compte tenu de l'atténuation des ultrasons dans les suspensions, ici le sang, la largeur optimale de la cellule de  
25 sédimentation 30 dépend de la fréquence ultrasonore utilisée.

A la fréquence de 3MHz, à laquelle la force de radiation des ultrasons permet d'agglomérer les hématies en quelques secondes, cette largeur est de 0,5 centimètre pour le sang  
30 total.

Le montage de la figure 5 permet, pour une suspension concentrée d'effectuer une séparation préliminaire ou pré-séparation.

35

La séparation finale peut ensuite intervenir, après cette pré-séparation, ou bien directement si la suspension initiale était peu concentrée.

Le montage de la figure 6 permet d'effectuer cette séparation finale.

Dans ce montage, le récipient 40 présente en partie gauche  
5 une entrée 41 pour le sang, en partie droite des sorties  
42H en haut pour le plasma et 42L en bas pour le culot.

Un générateur 43 excite un transducteur 44 mis au contact  
de la surface supérieure du liquide présent dans le réci-  
10 pient 40. A l'opposé, le fond du récipient 40 reçoit en  
45 soit un réflecteur, soit un autre transducteur ultra-  
sonore, comme on le verra ci-après.

L'organe 45 étant un pur réflecteur, le signal produit par  
15 le générateur 43 est wobulé dans les conditions indiquées  
plus haut. Les amas agglomérés sont alors déplacés vers  
le bas du fait de cette wobulation de fréquence, ou bien  
grâce à une excitation intermittente du générateur, auquel  
cas il y a alternance des phases d'agglomération et de sédimen-  
20 tation.

Si l'organe 45 est un autre transducteur, celui-ci est alors  
excité avec un signal de même fréquence que le transducteur  
44, mais avec un déphasage variable de façon linéaire ou  
25 quasi-linéaire avec le temps.

Ce déphasage crée un déplacement quasi-continu des noeuds  
et des ventres d'interférences, et entraîne un déplacement  
des hématies vers le bas, effet renforcé par l'accélération  
30 de la pesanteur, c'est-à-dire la gravitation.

Un montage analogue à celui de la figure 6, mais dans lequel  
les deux transducteurs sont montés horizontalement, de part  
et d'autre d'une membrane, permet d'effectuer la séparation  
35 finale avec cette membrane de filtration.

L'intérêt de l'usage d'ultrasons est qu'en ce cas la couche  
de polarisation habituellement rencontrée sur la membrane

peut être considérablement réduite ou même détruite par la force de radiation ultrasonore. Cela dépend de l'équilibre entre les forces hydrauliques, les forces visqueuses et les forces liées à la pression de radiation ultrasonore.

5

En pareil cas, le choix de la fréquence ultrasonore dépend de la taille des particules à filtrer. L'intensité acoustique nécessaire est fonction des caractéristiques de la suspension et de la pression transmembranaire. De préférence, 10 les deux transducteurs utilisés travaillent à la même fréquence, mais avec un déphasage quasi-linéaire dans le temps, et un taux de répétition choisi comme indiqué plus haut.

---

FABRIEAU 1

	ULTRASONS				DILUTION										
	V	F	T1	T2	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	
Contrôle	0		0	30'	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
Ultrasons	40	3.5	10"	12'	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
Ultrasons	40	3.5	20"	1'30"	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-





## Revendications.

1. Procédé de traitement biologique dans lequel on place dans un récipient (21) un milieu liquide biologique (22) contenant des particules en suspension, ce milieu et ces particules étant associés l'un à des anticorps, l'autre à des antigènes, de sorte qu'une réaction immunologique peut s'établir entre les anticorps et les antigènes et conduire éventuellement à une agglutination des particules, caractérisé en ce qu'on applique au milieu liquide (22) un faisceau cohérent d'ultrasons (23, 24, 25), à une fréquence comprise entre 0,1 et 100 MHz, capable de produire des forces de radiation favorisant le regroupement de ces particules.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise les forces de radiation produites par le faisceau d'ultrasons pour favoriser une réaction d'agglutination des particules.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise les forces de radiation produites par le faisceau d'ultrasons pour favoriser l'échange du milieu liquide biologique, à des fins de lavage, les particules étant regroupées.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la fréquence des ultrasons est comprise entre 0,5 et 20 MHz, environ.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on module la fréquence du champ d'ultrasons.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la densité de puissance du faisceau d'ultrasons est de 0,1 à 100 W/cm<sup>2</sup>, de préférence 0,5 à 20 W/cm<sup>2</sup>, environ.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le récipient (21) est mis extérieurement



au contact d'un milieu de transfert d'ultrasons, en particulièrement d'un liquide (29) tel que de l'eau, ou encore d'un milieu souple tel qu'un matériau à base de silicone.

- 5 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le récipient (21) comprend une multiplicité de capsules ou alvéoles et est constitué, par exemple, par une plaque de microtitration.
- 10 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la direction du champ ultrasonore dans le récipient est sensiblement alignée sur la verticale de celui-ci.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le milieu liquide (22) est de l'eau associée à un tampon de pH et contenant des protéines en solution, et en ce que les particules sont des cellules ou des microparticules propres à former substrat de réaction.
- 20 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le milieu liquide (22) est une solution d'hématies à faible concentration.
- 25 12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les particules sont des microparticules de latex.
13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le faisceau d'ultrasons, est appliqué de  
30 manière à établir un régime sensiblement stationnaire dans une direction de l'espace.
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le faisceau d'ultrasons est focalisé sur  
35 le milieu liquide, ce qui permet la remise en solution des particules sans effet de lyse lié à la cavitation.
15. Installation de traitement biologique, caractérisée

en ce qu'elle comporte une cellule à ultrasons, propre à appliquer un faisceau cohérent d'ultrasons, de fréquence comprise entre 0,1 et 100 MHz, à au moins un récipient contenant un milieu liquide biologique avec des particules en  
5 suspension, le faisceau étant capable de produire des forces de radiation favorisant le regroupement de ces particules.

FIG. 1

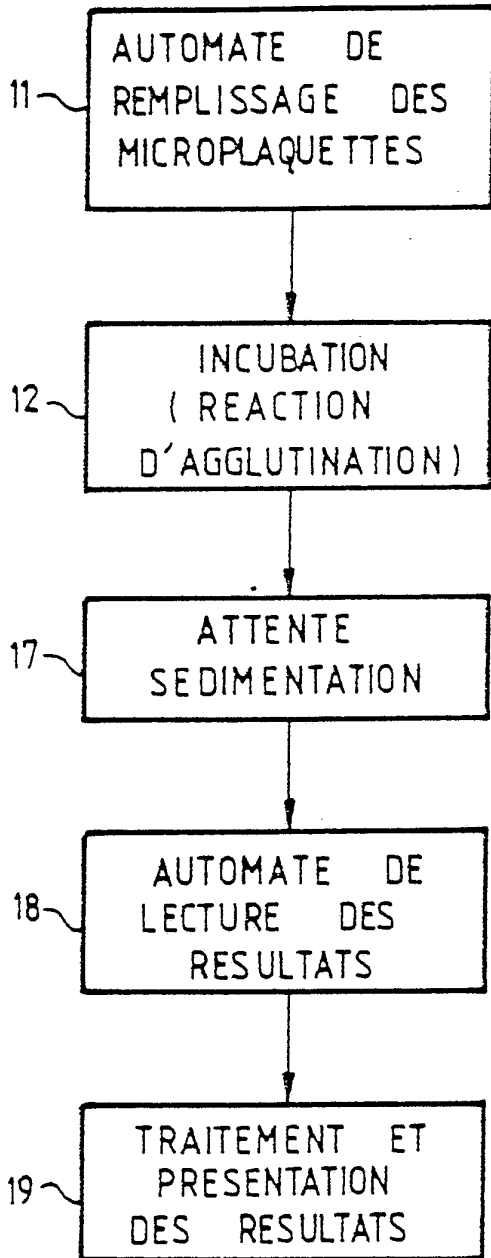
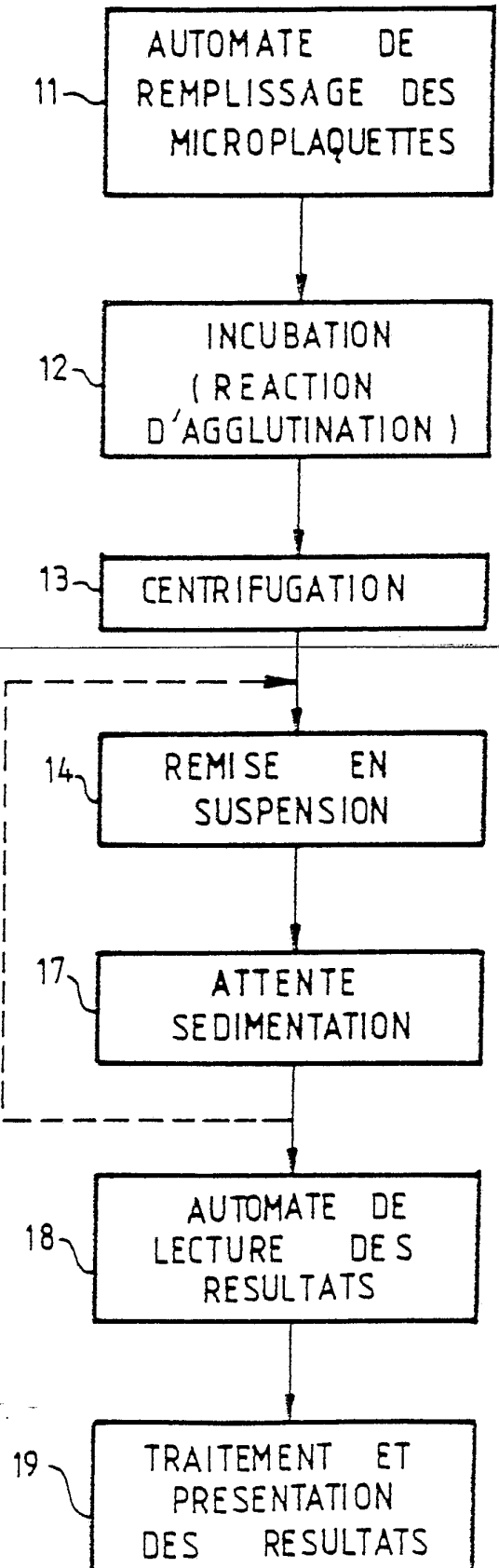


FIG. 1A



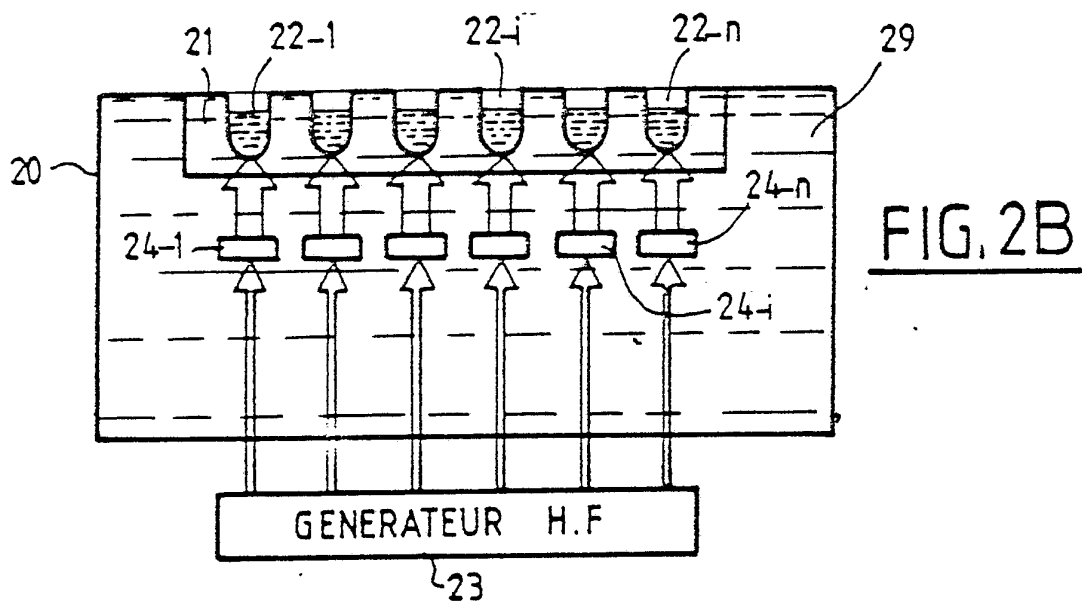
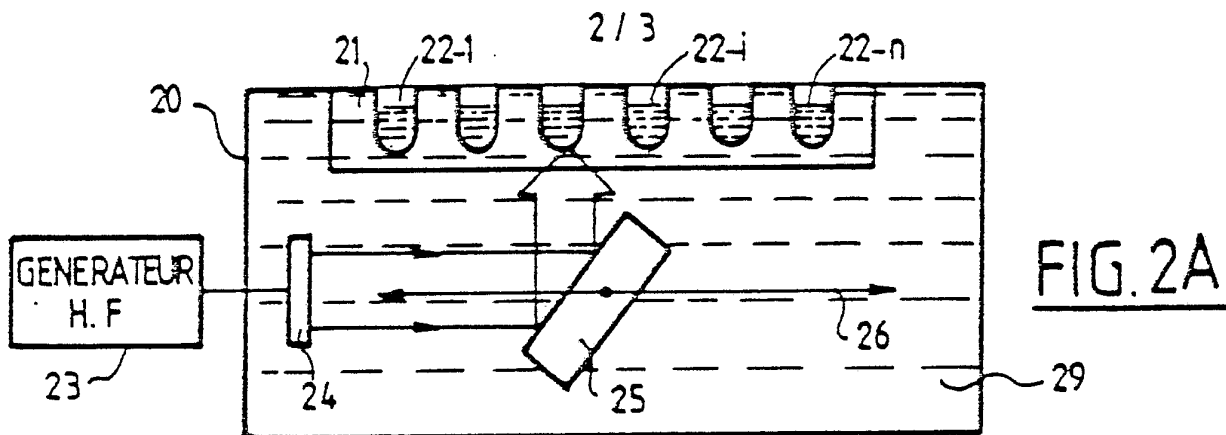


FIG. 3

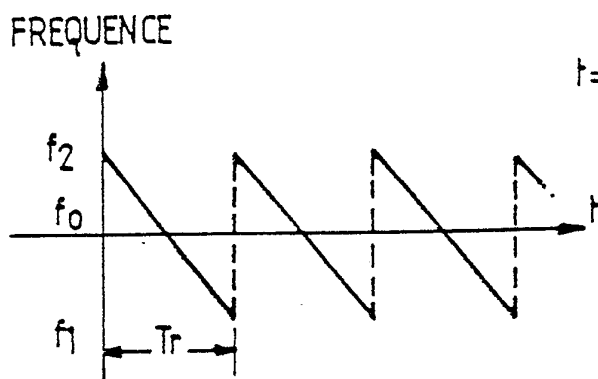


FIG. 3A

FIG. 3B

POSITION DES NOEUDS

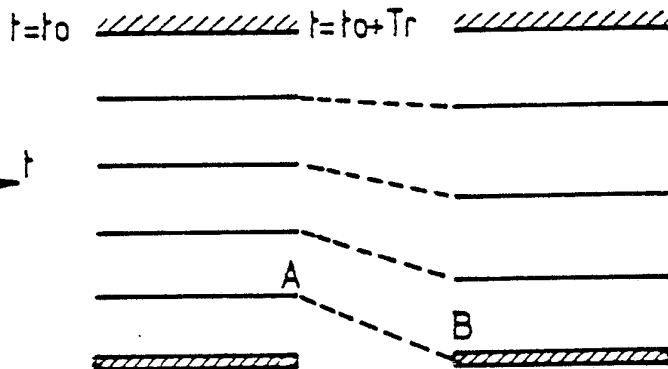


FIG. 4

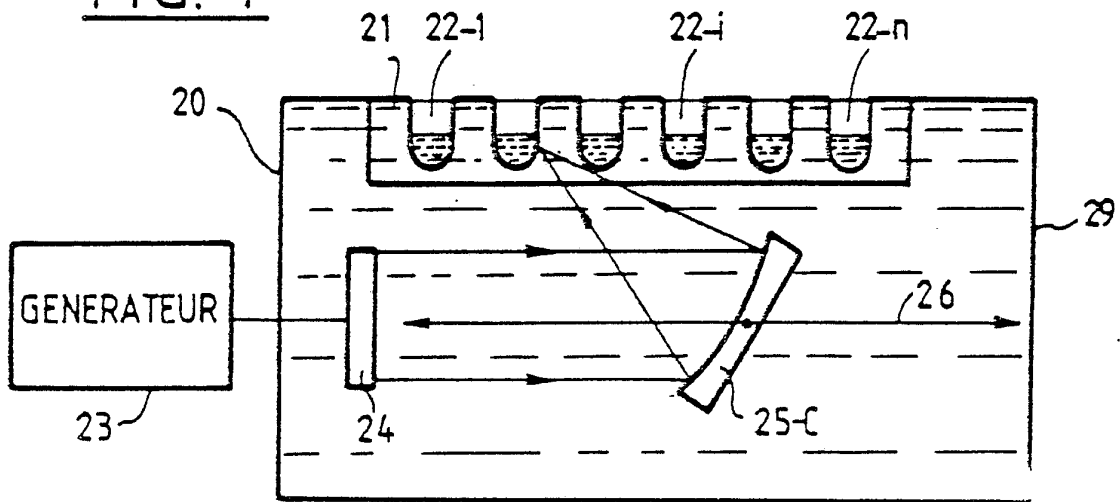


FIG. 5

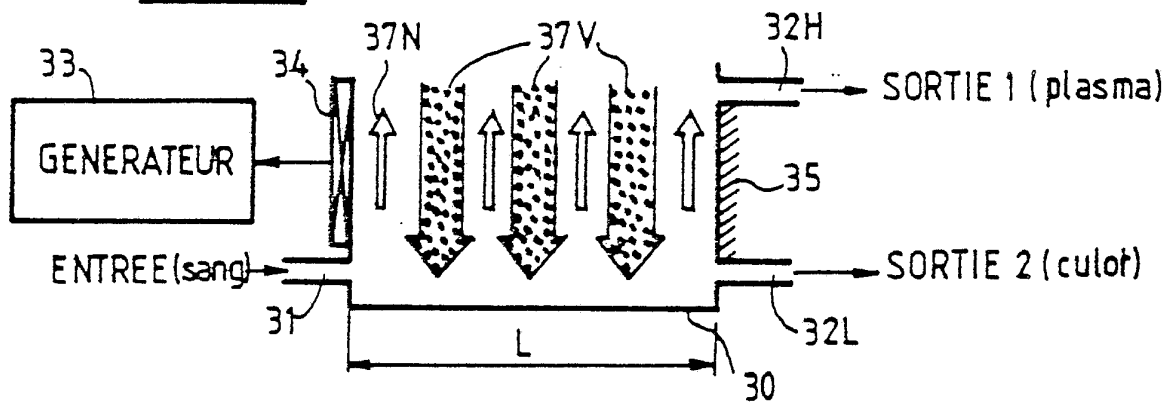
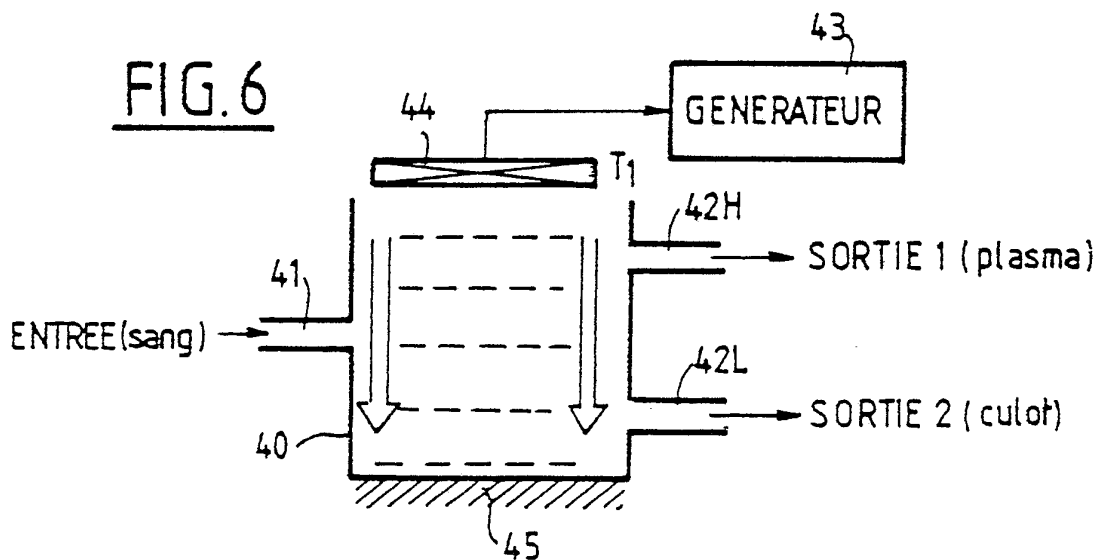


FIG. 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 87/00468

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Int.Cl.<sup>4</sup>: G 01 N 33/53; G 01 N 33/48</p>																	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <p style="text-align: center;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th style="width: 75%;">Classification Symbols</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;">Int.Cl.<sup>4</sup></td> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;">G 01 N 33/00</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></p>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. <sup>4</sup>	G 01 N 33/00											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl. <sup>4</sup>	G 01 N 33/00																
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category <sup>10</sup></th> <th style="width: 70%;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">                     EP, A, 0137678 (SYVA CO.) 17 April 1985                      see page 2, lines 28-33; page 5, lines 29-33; page 6, lines 1-9; page 6, line 35 - page 7, line 3; page 9, lines 10-19                      --                 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">                     US, A, 4615984 (R.L. STOKER) 7 October 1986                      see column 1, line 51 - column 2, line 41; column 7, line 29 - column 8, line 51                      --                 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-4,9-13,15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">                     Ultrasound in Medicine &amp; Biology, volume 4, 6 June 1978, Pergamon Press, (Guildford, GB),                      G. Ter Haar et al.: "Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: a physical analysis", pages 111-123                      see page 111, column 1, lines 17-34; page 119, column 1, lines 1-10                      cited in the application                      --                 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">4-6,13-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">                     Acustica, volume 56, October 1984, ./.                      --                 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">4-6,13-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	X	EP, A, 0137678 (SYVA CO.) 17 April 1985 see page 2, lines 28-33; page 5, lines 29-33; page 6, lines 1-9; page 6, line 35 - page 7, line 3; page 9, lines 10-19 --	1-15	X	US, A, 4615984 (R.L. STOKER) 7 October 1986 see column 1, line 51 - column 2, line 41; column 7, line 29 - column 8, line 51 --	1-4,9-13,15	X	Ultrasound in Medicine & Biology, volume 4, 6 June 1978, Pergamon Press, (Guildford, GB), G. Ter Haar et al.: "Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: a physical analysis", pages 111-123 see page 111, column 1, lines 17-34; page 119, column 1, lines 1-10 cited in the application --	4-6,13-15	X	Acustica, volume 56, October 1984, ./. --	4-6,13-15
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>															
X	EP, A, 0137678 (SYVA CO.) 17 April 1985 see page 2, lines 28-33; page 5, lines 29-33; page 6, lines 1-9; page 6, line 35 - page 7, line 3; page 9, lines 10-19 --	1-15															
X	US, A, 4615984 (R.L. STOKER) 7 October 1986 see column 1, line 51 - column 2, line 41; column 7, line 29 - column 8, line 51 --	1-4,9-13,15															
X	Ultrasound in Medicine & Biology, volume 4, 6 June 1978, Pergamon Press, (Guildford, GB), G. Ter Haar et al.: "Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: a physical analysis", pages 111-123 see page 111, column 1, lines 17-34; page 119, column 1, lines 1-10 cited in the application --	4-6,13-15															
X	Acustica, volume 56, October 1984, ./. --	4-6,13-15															
<p style="font-size: 0.8em;">* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p style="font-size: 0.8em;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p style="font-size: 0.8em;">"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p style="font-size: 0.8em;">"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p style="font-size: 0.8em;">"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p style="font-size: 0.8em;">"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p style="font-size: 0.8em;">"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p style="font-size: 0.8em;">"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p style="font-size: 0.8em;">"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p style="font-size: 0.8em;">"&amp;" document member of the same patent family</p>															
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 Date of the Actual Completion of the International Search  <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">12 February 1988 (12.02.88)</p> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">                 Date of Mailing of this International Search Report  <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">17 March 1988 (17.03.88)</p> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">                 International Searching Authority  <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.1em;">EUROPEAN PATENT OFFICE</p> </td> <td style="padding: 5px;">                 Signature of Authorized Officer             </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">12 February 1988 (12.02.88)</p>	Date of Mailing of this International Search Report <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">17 March 1988 (17.03.88)</p>	International Searching Authority <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.1em;">EUROPEAN PATENT OFFICE</p>	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">12 February 1988 (12.02.88)</p>	Date of Mailing of this International Search Report <p style="text-align: center; font-size: 1.1em;">17 March 1988 (17.03.88)</p>																
International Searching Authority <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.1em;">EUROPEAN PATENT OFFICE</p>	Signature of Authorized Officer																

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	(Stuttgart, DE), M.A.H. Weiser et al.: "Interparticle forces on red cells in a standing wave field", pages 114-119, see page 117, column 2, point 6, line 1 - page 118, column 2, "Acknowledgements", cited in the application ---	
X	Nature, volume 239, 13 October 1972, (London, GB), N. Vashon Baker: "Segregation and sedimentation of red blood cells in ultrasonic standing waves", pages 398-399, see page 398, column 2, lines 10-13; page 399, column 1, lines 12-14; page 399, column 1, lines 32-37 cited in the application -----	1-6, 11, 15

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 8700468

SA 19784

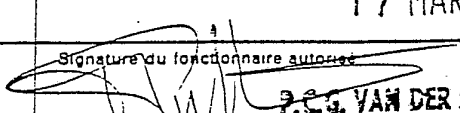
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 02/03/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0137678	17-04-85	JP-A- 60071957	23-04-85
		US-A- 4575485	11-03-86
		CA-A- 1231304	12-01-88
-----			
US-A- 4615984	07-10-86	Aucun	
-----			



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/EP 87/00468

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>4</sup> : G 01 N 33/53; G 01 N 33/48		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>4</sup>	G 01 N 33/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	EP, A, 0137678 (SYVA CO.) 17 avril 1985 voir page 2, lignes 28-33; page 5, lignes 29-33; page 6, lignes 1-9; page 6, ligne 35 - page 7, ligne 3; page 9, lignes 10-19 --	1-15
X	US, A, 4615984 (R.L. STOKER) 7 octobre 1986 voir colonne 1, ligne 51 - colonne 2, ligne 41; colonne 7, ligne 29 - colonne 8, ligne 51 --	1-4, 9-13, 15
X	Ultrasound in Medicine & Biology, volume 4, 6 juin 1978, Pergamon Press, (Guildford, GB), G. Ter Haar et al.: "Blood cell banding in ultrasonic standing wave fields: a physical analysis", pages 111-123 voir page 111, colonne 1, lignes 17-34; page 119, colonne 1, lignes 1-10 cité dans la demande	4-6, 13-15
<p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
12 février 1988	17 MAR 1988	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 P.C.G. VAN DER PUTTEN	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	Acustica, volume 56, octobre 1984, (Stuttgart, DE), M.A.H. Weiser et al.: "Interparticle forces on red cells in a standing wave field", pages 114-119 voir page 117, colonne 2, point 6, ligne 1 - page 118, colonne 2, "Acknowledgements" cité dans la demande	4-6,13-15
X	Nature, volume 239, 13 octobre 1972, (Londres, GB), N. Vashon Baker: "Segregation and sedimentation of red blood cells in ultrasonic standing waves", pages 398-399 voir page 398, colonne 2, lignes 10-13; page 399, colonne 1, lignes 12-14; page 399, colonne 1, lignes 32-37 cité dans la demande	1-6,11,15

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 8700468

SA 19784

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 02/03/88  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0137678	17-04-85	JP-A- 60071957	23-04-85
		US-A- 4575485	11-03-86
		CA-A- 1231304	12-01-88
US-A- 4615984	07-10-86	Aucun	

EPO FORM 1047Z

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82