

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 931 557**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **08 02729**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **G 01 N 33/72 (2006.01), G 01 N 33/53**

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20.05.08.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 27.11.09 Bulletin 09/48.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIOCODE HYCEL FRANCE SA Société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : BOUCHER PATRICIA et HERMAN JEAN PIERRE.

⑦3 Titulaire(s) : *BIOCODE HYCEL FRANCE SA Société anonyme.*

⑦4 Mandataire(s) : CABINET GERMAIN ET MAUREAU.

⑤4 **PROCEDE DE DETERMINATION DU TAUX D'HEMOGLOBINE, DE NUMERATION ET DE DIFFERENCIATION DES GLOBULES BLANCS ET MILIEU ADAPTE.**

⑤7 L'invention concerne un procédé de détermination, dans un échantillon sanguin, du taux d'hémoglobine, de numération et de différenciation des globules blancs, comprenant les étapes suivantes:

On met l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, en l'absence d'ions cyanure et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agent bactériostatique,

On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et

On dénombre les globules; blancs et on les différencie en au moins trois sous-populations.

L'invention concerne aussi un milieu pour mettre en oeuvre le procédé.

FR 2 931 557 - A1



L'invention concerne un procédé et un milieu de réaction pour, à la fois, déterminer sans produit toxique tel que le cyanure le taux d'hémoglobine, dénombrer et différencier les globules blancs (GB) sur une même dilution d'un échantillon sanguin.

Les méthodes traditionnelles de mesure de l'hémoglobine reposaient sur la détection en spectrophotométrie à 540 nm, d'un complexe chromogène formé entre des ions cyanures et l'hémoglobine sous une forme oxydée, la méthémoglobine. L'échantillon sanguin à analyser était exposé à un milieu de réaction aqueux contenant des sels de cyanure (cyanure de potassium) et des sels de ferricyanure (ferricyanure de potassium ou de sodium). En milieu aqueux, les globules rouges (GR) sont lysés, l'hémoglobine est oxydée en méthémoglobine par les ions ferricyanure et cyanures, lesquels possèdent une forte affinité vis-à-vis de l'hème ; ils forment un complexe cyanméthémoglobine, dont le maximum d'absorbance est à 540nm. La mesure de l'hémoglobine est faite par spectrophotométrie.

Par la suite, pour accélérer la lyse des GR, un sel d'ammonium quaternaire a été ajouté en faible concentration au milieu réactionnel. On s'est cependant heurté à un problème d'agglutination des complexes formés entre les ions ferrocyanures et les groupes ammonium quaternaire ; ces agglutinats présentent une turbidimétrie qui gêne la mesure photométrique de l'hémoglobine. Pour cette raison, les sels de ferricyanure ont été abandonnés, alors que le sel de cyanure est conservé.

Des automates ont été développés pour analyser rapidement l'hémoglobine, le nombre de GR et de GB dans les échantillons sanguins. Les milieux de réaction ont dû aussi évoluer parallèlement ; pour compter les GR et les GB, on est passé d'un diluant aqueux à un diluant isotonique ou faiblement hyperosmolaire. Dans ces conditions, il a été nécessaire d'augmenter la concentration en ammonium quaternaire pour lyser les GR.

Ces techniques présentent l'inconvénient majeur d'impliquer des ions cyanure, toxiques.

Des méthodes ne nécessitant plus d'ions cyanure ont été mises au point.

I. Oshiro et al. Clin. Biochem. 15(1) 83-88 (1982), proposent un procédé de détermination du taux d'hémoglobine dans un échantillon sanguin,

mettant en jeu du lauryl sulfate de sodium (SLS), en l'absence de tout ion cyanure. Le SLS mis au contact de l'échantillon provoque l'hémolyse des GR, entraîne la conversion de l'hémoglobine en méthémoglobine par oxydation de l'atome de fer. Le complexe stable formé est détecté en spectrophotométrie d'absorption. Le SLS, même aux concentrations les plus faibles indiquées, 5 provoque une lyse de l'ensemble des cellules, y compris des GB qui sont réduits à l'état de noyaux. Cette méthode utilise une forte dilution qui ne permet pas le comptage des GB avec une imprécision acceptable pour un temps de comptage limité. En outre le dénombrement différentiel n'est pas accessible.

10 Le document US5468640A décrit un procédé rapide de détermination du taux d'hémoglobine, dans un échantillon sanguin, selon lequel on met ledit échantillon au contact d'un milieu de réaction, à un pH de 11,3-13,7, comprenant un tensioactif ionique, également exempt de tout ion cyanure. Soit le tensioactif est aussi une base forte, comme l'hydroxyde de stéaryltrialkylammonium, et il confère le pH requis au milieu, soit il n'est pas 15 une base forte, par exemple le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), et une base forte doit être ajoutée, par exemple un hydroxyde de métal alcalin. Après hémolyse des GR par le tensioactif, l'action de ce dernier et de celle de la base forte entraînent la dénaturation de l'hémoglobine, l'exposition des 20 hèmes de l'hémoglobine à l'oxygène de l'air provoquant l'oxydation de l'atome de fer. Le complexe formé entre les hèmes ferriques et les ions hydroxyde est détecté en spectrophotométrie d'absorption. Comme le procédé précédemment décrit, cette méthode ne permet pas de déterminer la différenciation des GB, car les conditions drastiques provoquent inévitablement leur lyse à l'état de 25 noyaux.

Le document US6740527A divulgue un procédé de détermination du taux d'hémoglobine d'un échantillon sanguin, toujours dépourvu d'ion cyanure, qui permet en outre de donner une numération des GB. L'échantillon est d'abord dilué, puis mis en contact avec un milieu de réaction qui comprend 30 un agent de lyse consistant en 0,1-20% en poids d'au moins un sel d'ammonium quaternaire et 0,1-15% en poids d'un sel d'hydroxylamine. Cette méthode permet de mesurer le taux d'hémoglobine et de dénombrer les GB, mais il ne permet pas de différencier ces derniers.

Déterminer le taux d'hémoglobine, le nombre de GB et la 35 différenciation des GB avec un seul agent de lyse sur un analyseur automatique d'hématologie permet de réduire le nombre de réactifs utilisés et

de simplifier l'organisation fluide de l'analyseur. Ce sont des facteurs de robustesse du système et de réduction des coûts de fabrication et de fonctionnement.

5 L'invention apporte un procédé simple permettant, dans le même échantillon sanguin, à la fois de déterminer le taux d'hémoglobine, et de dénombrer et différencier les GB. Ce procédé met en jeu les techniques de lecture et de mesure classiquement employées dans le domaine de la formulation sanguine et n'implique aucune entité chimique toxique, comme les ions cyanures par exemple.

10 Le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

On met l'échantillon sanguin au contact d'un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, dépourvu d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et au moins un agent bactériostatique.

15 On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et

On dénombre les GB et on les différencie en au moins trois sous populations.

20 Pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, le ou les sels d'ammonium quaternaire répondent avantageusement aux caractéristiques suivantes, considérées seules ou en combinaison :

Le ou les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi les composés de formule (I)  $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$ , dans laquelle

25 R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone,

R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH,  $CH_3SO_4$  et  $PO_4$ .

30 R1 peut représenter une chaîne hydrocarbonée ayant de 10 à 18 atomes de carbone et alors le ou lesdits sels sont de préférence choisis parmi les sels de dodécyltriméthylammonium, de myristyltriméthyl ammonium, de palmityltriméthyl ammonium et de stéaryltriméthylammonium.

35 R1 peut aussi représenter une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et le ou lesdits sels sont de préférence choisis parmi les sels de tétraéthyl ammonium.

Bien entendu, selon l'invention, ledit milieu peut comprendre plusieurs sels d'ammonium quaternaire, en particulier plusieurs sels de formule (I), et par exemple un ou des sels de formule (I) où R1 est une chaîne en C10-C18 et/ou un ou des sels de formule (I) où R1 est une chaîne en C1-C6.

5 Des sels particulièrement adaptés sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium et l'hydroxyde de tétraéthylammonium, employés seuls ou en mélange.

Par rapport au poids du milieu, la proportion du ou des sels d'ammonium quaternaire varie de 2 à 4% en poids.

10 Comme dit précédemment, le milieu comprend un ou des agents bactériostatiques de préférence choisis parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium.

Le milieu peut en outre contenir d'autres ingrédients :

15 un agent stabilisateur, par exemple l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA),

au moins un tensioactif non ionique, tel que le Triton®.

20 Le taux d'hémoglobine peut être mesuré par les techniques classiques de spectrophotométrie. Le dénombrement des GB est effectué par une méthode elle aussi classique basée par exemple sur le principe d'impédance qui, selon le procédé de l'invention, permet aussi de différencier les GB en au moins les trois sous-populations suivantes : les lymphocytes, les cellules monocytaires (autres que les lymphocytes) et les granulocytes.

25 Selon une variante du procédé de l'invention, le milieu contient au moins un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone. Dans ces conditions, et associées à une méthode biparamétrique d'impédance et de mesure laser aux grands angles, elle aussi classique, on peut différencier au moins les quatre  
30 sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes éosinophiles et les granulocytes neutrophiles.

Le milieu peut aussi comprendre jusqu'à trois sels d'ammonium quaternaire, voire plus.

35 Selon une mise en œuvre préférée du procédé, l'échantillon sanguin est dilué en milieu légèrement hyperosmolaire et tamponné à pH

neutre. Un pH supérieur à 10 provoque une lyse partielle des GB empêchant leur comptage différentiel.

L'invention concerne aussi un milieu pour la détermination du taux d'hémoglobine et pour le dénombrement et la différenciation des globules  
5 blancs, ledit milieu étant exempt d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire. Celui-ci est avantageusement choisi parmi les composés de formule I,  $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$  dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes  
10 de carbone

R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe  
alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH,  $CH_3SO_4$   
et  $PO_4$ ,

et un agent bactériostatique.

15 Ce milieu est avantageusement celui décrit précédemment et en présente les mêmes caractéristiques, considérées seules ou en combinaison.

Un milieu préféré comprend les sels d'ammonium quaternaire  
suivants : le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de  
dodécyltriméthyl ammonium, l'hydroxyde de tétraéthylammonium.

20 Avantageusement, la proportion du bromure de myristyltriméthyl ammonium varie de 20-40 g/L, celle du chlorure de dodécyltriméthyl ammonium de 1-10 g/L et celle de l'hydroxyde de tétraéthylammonium de 1-5 g/L.

Il peut en outre comprendre au moins un agent bactériostatique de  
préférence choisi parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium.

25 La proportion de diméthylurée y varie de 1-10 g/L et celle du le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium de 1-10 g/L.

Il peut encore comprendre un agent stabilisateur, tel que l'acide  
éthylène diamine tétra acétique (EDTA), dont la proportion varie de préférence  
de 1-10 g/L.

30 Comme dit précédemment, ce milieu est avantageusement isotonique ou hyperosmolaire, de préférence légèrement hyperosmolaire.

Les objets de l'invention sont exposés plus en détails et illustrés  
dans les exemples ci-après.

### Exemple 1 : formulation d'un milieu selon l'invention

Le milieu approprié comprend un diluant et un agent de lyse et de réaction, comme suit :

En tant que diluant, une solution aqueuse composée de :

5 un tampon organique phosphate, par exemple hydrogénophosphate de sodium ou phosphate disodique anhydre  
un stabilisateur des membranes, par exemple chlorure ou sulfate de sodium

10 des agents bactériostatiques, par exemple diméthylurée et 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium

un agent stabilisant par exemple EDTA disodique (EDTA.Na<sub>2</sub>)

et en tant qu'agent de lyse, une solution aqueuse composée de :

un mélange de bromure de myristyltriméthyl ammonium, chlorure de dodécyltriméthyl ammonium et hydroxyde de tétraéthylammonium,

15 Triton<sup>®</sup>, en tant que tensioactif non ionique,

chlorure de sodium en tant que stabilisateur des membranes, identique ou différent de celui du diluant, et

l'eau désionisée.

20 Le diluant a une osmolarité comprise entre 320-360 mOsm/Kg à pH neutre et l'agent de lyse a un pH de 10,5 +/- 0.4. Le milieu réactionnel obtenu a un pH proche de 8.

### Exemple 2 : mise en œuvre du procédé sur un analyseur dit « 3 populations »

#### 25 **Préparation de l'échantillon sanguin :**

Environ 16 µl de sang sont prélevés du tube où l'échantillon a été recueilli. L'aiguille est rincée intérieurement et extérieurement avec du diluant, au-dessus de la cuvette de rinçage. Ensuite, 3,5 ml du diluant décrit à l'exemple 1 sont ajoutés pour obtenir une première dilution (1/219). Une  
30 seconde dilution est faite avec 31,2µl de cette première dilution et 4ml du diluant (1/128). Les dilutions sont transférées par vide vers les chambres de comptage. Pendant la dilution des GR, 0,41 ml d'agent de lyse est ajouté à la première dilution dans la chambre de comptage des GB. La dilution finale est d'environ 1/244 pour les GB et de 1/28200 pour les GR/Plaquettes. Une fois les  
35 transferts effectués, les cuvettes de dilution sont remplies de diluant pour les rincer.

**Comptages :**

Une séquence de comptage est effectuée comme suit :

180µl de la première dilution sont mesurés volumétriquement pour dénombrer les GB alors que 100µl environ de la seconde dilution sont mesurés pour les GR/Plaquettes.

Le volume de la dilution des GB est contrôlé par deux barrières optiques dans un tube volumétrique. Pendant le comptage volumétrique, les données sont réparties dans 4 tables de 2 secondes chacune pour une utilisation statistique.

Le comptage GR/Plaquettes débute avec le comptage des GB et s'arrête exactement après 8 secondes.

**Différenciation en trois populations de GB :**

Les différentes sous-populations de GB sont différenciées sur des critères de taille en contrôlant les conditions de lyse (diluant, agent de lyse, temps d'action). Quand ces conditions sont réunies, la réaction chimique qui s'effectue permet de distinguer trois populations de GB : les lymphocytes, les granulocytes et les cellules de taille moyenne (basophiles + monocytes + une partie des éosinophiles + de jeunes granulocytes).

Après le processus de lyse, les lymphocytes sont les plus petites cellules avec leur petit noyau et corrént avec les cellules comprises entre 25 et 90 ± 5 fL (paramétrable) sur l'histogramme de distribution des GB (en mode humain) non représenté.

Les cellules moyennes se trouvent dans la région située entre les lymphocytes et les granulocytes.

Après action de la lyse, elles sont corrélées avec les cellules entre 90 ± 5 et 140 ± 5 fL (modifiable) sur l'histogramme de distribution des GB, non représenté. Certains éosinophiles peuvent cependant dépasser 220 fL.

Les granulocytes neutrophiles, après action de la lyse, sont les plus grosses cellules avec leurs noyaux polysegmentés retenant une partie du cytoplasme. Les neutrophiles sont corrélés avec les cellules entre 140 ± 10 et 449 fL sur l'histogramme de distribution des GB, non représenté.

**Hémoglobine**

La source lumineuse, une diode électroluminescente (LED) verte (555 nm), permet de calculer l'absorbance qui est proportionnelle à la concentration en hémoglobine de l'échantillon. Le trajet optique est déterminé par deux conduits optiques dans la chambre des GB. La référence Hb est



mémorisée pendant la mise en route ou quand la chambre est remplie de diluant.

Exemple 3 : Mise en œuvre du procédé sur un analyseur au moins

5 4 populations

**Préparation de l'échantillon sanguin :**

150 $\mu$ L de sang sont prélevés du tube où le sang a été recueilli au préalable. La colonne de sang est aspirée par l'analyseur à travers une vanne céramique où 25 $\pm$ 1 $\mu$ L sont échantillonnés pour former une première dilution au  
10 1/72 environ avec 1800 $\mu$ L de diluant faiblement hypertonique à pH neutre.

Une seconde dilution est faite en cascade avec 25 $\pm$ 1 $\mu$ L et environ 2mL de diluant afin de mesure au 1/6000 GR et Plaquettes.

475 $\mu$ L de la prédilution sont repris avec 210 $\mu$ L d'agent de lyse et 1440 $\mu$ L du diluant environ pour obtenir une dilution finale au 1/251.

15 **Mesures :**

L'hémoglobine est mesurée à 560nm directement dans la cuve de préparation des GB au bout de 15 secondes.

Cette dilution GB/Hb au 1/251 est ensuite transférée dans un cytomètre où 267 $\mu$ L sont injectés au travers d'un micro orifice de 75 $\mu$ m et d'un  
20 faisceau laser focalisé à proximité, dans une architecture à double flux hydrodynamique. Ce double dispositif de mesure d'impédance électrique et de mesure laser aux grands angles permet de dénombrer les GB et de déterminer au moins 4 sous populations leucocytaires : lymphocytes, monocytes, granulocytes érythrocytaires, granulocytes neutrophiles, mais également la  
25 mise en évidence du plasmodium vivax, le signalement d'agglutinats plaquettaires ou de GR nucléés.

67  $\mu$ L de la dilution au 1/6000 sont à leur tour transférés et injectés au travers d'un micro orifice de 75 $\mu$ m dans une architecture à double flux hydrodynamique pour le comptage des GR et des plaquettes.

30

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de détermination, dans un échantillon sanguin, du taux d'hémoglobine, de numération et de différenciation des globules blancs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 On met l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, en l'absence d'ions cyanure et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agent bactériostatique,

10 On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et

On dénombre les globules blancs et on les différencie en au moins trois sous-populations.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi les composés de formule (I)  
15  $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$  dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone,

R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

20 X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH,  $CH_3SO_4$  et  $PO_4$ .

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 10 à 18 atomes de carbone.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi les sels de dodécyltriméthylammonium, de myristyltriméthyl ammonium, de palmityltriméthyl ammonium et de stéaryltriméthylammonium.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi les sels de tétraéthyl ammonium.

7. Procédé selon la revendication 4 ou 6, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium et l'hydroxyde de  
35 tétraéthylammonium.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la proportion du ou des sels d'ammonium quaternaire varie de 2 à 4% en poids par rapport au poids du milieu.

5 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'agent bactériostatique est le diméthylurée.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit milieu contient en outre un agent stabilisateur.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agent stabilisateur est l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

10 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que ledit milieu contient en outre au moins un tensioactif non ionique.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le tensioactif non ionique est le Triton®.

15 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on dénombre les globules blancs par impédance et on différencie les trois sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes autres que les lymphocytes et les granulocytes.

20 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce que le milieu contient au moins un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone.

25 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'on dénombre les globules blancs par une méthode biparamétrique d'impédance et de mesure laser aux grands angles et on différencie les quatre sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes, les éosinophiles et les neutrophiles.

30 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le milieu comprend trois sels d'ammonium quaternaire.

35 18. Milieu pour la détermination du taux d'hémoglobine et pour le dénombrement et la différenciation des globules blancs, ledit milieu étant exempt d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire choisi parmi les composés de formule I

$NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$  dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone

R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

5 X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH, CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> et PO<sub>4</sub>,

et un agent bactériostatique.

10 19. Milieu selon la revendication 18, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium, l'hydroxyde de tétraéthylammonium.

15 20. Milieu selon la revendication 19, caractérisé en ce que la concentration du bromure de myristyltriméthyl ammonium varie de 20-40 g/L, celle du chlorure de dodécyltriméthyl ammonium de 1-10 g/L, et celle de l'hydroxyde de tétraéthylammonium de 1-5 g/L.

21. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisé en ce que l'agent bactériostatique est choisi parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium.

20 22. Milieu selon la revendication 21, caractérisé en ce que la concentration de diméthylurée varie de 1-10 g/L, et celle du 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium de 1-10 g/L.

23. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, caractérisé en ce qu'il contient en outre un agent stabilisateur.

25 24. Milieu selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'agent stabilisateur est l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

25. Milieu selon la revendication 24, caractérisé en ce que la concentration de l'EDTA varie de 1 à 10 g/L.

30 26. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 25, caractérisé en ce qu'il contient un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 707721  
FR 0802729

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2006/118818 A (BECKMAN COULTER INC [US]) 9 novembre 2006 (2006-11-09) * alinéas [0014] - [0017], [0031], [0037]; revendications 1,11 *	1-26	G01N33/72 G01N33/53
D,X	US 5 958 781 A (WONG SHOW-CHU [US] ET AL) 28 septembre 1999 (1999-09-28) * colonne 5, ligne 42 - colonne 6, ligne 15 *	18-26	
A	EP 0 424 871 A (TOA MEDICAL ELECTRONICS [JP]) 2 mai 1991 (1991-05-02) * le document en entier *	1-26	
A	US 5 468 640 A (BENEZRA JEFFREY [US] ET AL) 21 novembre 1995 (1995-11-21) * le document en entier *	1-26	
A	WO 96/02841 A (ABBOTT LAB [US]) 1 février 1996 (1996-02-01) * le document en entier *		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	OSHIRO I ET AL: "NEW METHOD FOR HEMOGLOBIN DETERMINATION BY USING SODIUM LAURYL SULFATE (SLS)" CLINICAL BIOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, XX, vol. 15, no. 1, 1 janvier 1982 (1982-01-01), pages 83-88, XP008058143 ISSN: 0009-9120 * le document en entier *	1-26	G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 janvier 2009		Jacques, Patrice	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                      Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie                      A : arrière-plan technologique                      O : divulgation non-écrite                      P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.                      D : cité dans la demande                      L : cité pour d'autres raisons                      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0802729 FA 707721**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 20-01-2009

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006118818	A	09-11-2006	CN 101163972 A	16-04-2008
			EP 1877802 A2	16-01-2008
			JP 2008541046 T	20-11-2008
			US 2006263889 A1	23-11-2006
-----				
US 5958781	A	28-09-1999	US 6740527 B1	25-05-2004
-----				
EP 0424871	A	02-05-1991	CA 2027450 A1	24-04-1991
			DE 69016348 D1	09-03-1995
			DE 69016348 T2	29-06-1995
			JP 2836865 B2	14-12-1998
			JP 3137566 A	12-06-1991
			US 5250437 A	05-10-1993
-----				
US 5468640	A	21-11-1995	AUCUN	
-----				
WO 9602841	A	01-02-1996	AU 3094695 A	16-02-1996
			EP 0770216 A1	02-05-1997
			JP 10503016 T	17-03-1998
			JP 3529786 B2	24-05-2004
-----				