

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503803

(P2005-503803A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/02	C 1 2 N 1/02	2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/12	C 1 2 M 1/12	2 G 0 5 2
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/48 B	4 B 0 6 3
// C 1 2 M 1/34	G 0 1 N 1/28 J	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-529979 (P2003-529979)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月13日 (2002. 9. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月12日 (2004. 3. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/003132
 (87) 国際公開番号 W02003/025207
 (87) 国際公開日 平成15年3月27日 (2003. 3. 27)
 (31) 優先権主張番号 01/11873
 (32) 優先日 平成13年9月13日 (2001. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

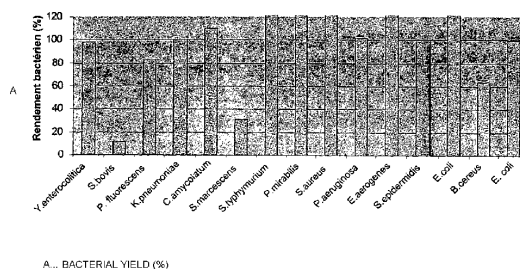
(71) 出願人 504097627
 ヘモシステム
 HEMOSYSTEM
 フランス国、マルセイユ エフ-1300
 6、クール グーフ、45
 45, cours Gouffe, F-1
 3006 Marseille, Fran
 ce
 (74) 代理人 100092897
 弁理士 大西 正悟
 (74) 代理人 100115200
 弁理士 山口 修之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液製剤及び／又はその派生物からの病原菌の濃縮及び検出装置及び方法

(57) 【要約】

本発明は、次のステップ、a) 血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を受けさせる、b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第1フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ(a)で形成した凝集体を除去する、c) ステップ(b)で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、d) 細胞片を通す第2フィルタに、ステップ(c)の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収する、及びe) 場合により留め置かれる汚染菌を検出するために第2フィルタを分析することを含む、血液製剤又は派生製品中に場合により存在する病原菌濃縮装置及び方法、並びに前記菌の検出を対象とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の濃縮方法であって、次のステップ：

- a) 前記血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を受けさせる、
- b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第 1 フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ (a) で形成した凝集体を除去する、
- c) ステップ (b) で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、
- d) 細胞片を通す第 2 フィルタに、ステップ (c) の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収することを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

血液細胞を含む血液製剤中の汚染菌の検出方法であって、請求項 1 に記載の方法のステップ (a) から (d) により前記菌をフィルタで濃縮すること、次に：

(e) 場合により留め置かれる汚染菌を検出するために第 2 フィルタを分析することの特徴とする方法。

【請求項 3】

ステップ (a) の凝集の際か、ステップ (c) の溶解の際か、分析ステップ (e) の際、第 2 フィルタに直接に汚染菌のマーキング剤を添加することを含むことを特徴とする請求項 2 に記載の検出方法。

【請求項 4】

ステップ (a)、(c) 又は (e) の少なくとも 1 つで、汚染菌の透過化処理剤の添加を含むことを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

透過化処理剤は：ポリエチレンジアミン、二酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、単独の、又はナイシンと組み合わせたエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、洗剤又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

洗剤は：N - オクチル β - D - グルコピラノシド、SDS、ツイーン、トリトン、Brij 又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

病原菌のマーキング剤は、ChemChrome V6 のようなエステラーゼ基質、マークされた抗体又は核酸マーカを含む群から選択されるマーキング溶液であることを特徴とする請求項 3 から 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

マーキング剤は、蛍光マーカ、又は蛍光色素、若しくは蛍光にされる基質の分解を可能にする酵素に連結される薬剤を含むことを特徴とする請求項 3 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

蛍光は、レーザー励起によって検出されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

血液製剤の血液細胞は、血小板若しくは赤血球、又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 11】

血液製剤は、血小板を含むこと、及びステップ (a) の凝集処理は：

- 血小板抗原の特異性抗体、
- トロンビン、TRAP (トロンビンレセプタ活性化ペプチド)、トリプシン、コラーゲン、トロンボキサン A₂、PAF (血小板活性化因子)、イオノホア A₂₃₁₈₇、免疫複合体及び補体因子から選択される強い血小板活性化作用薬、
- ADP、アドレナリン、アラキドン酸、フォン・ヴィレブラント因子、セロトニン又はエピネフリンから選択される弱い血小板活性化作用薬を含む群から選択される凝集剤の少

50

なくとも1つを含む凝集組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

凝集組成物中のCD9タイプの抗体の濃度は、 $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $5 \mu\text{g/ml} \sim 40 \mu\text{g/ml}$ であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】

凝集組成物中の強い作用薬の濃度は：

- トロンビンタイプの作用薬に関して $0.5 \text{UI/ml} \sim 100 \text{UI/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \text{UI/ml} \sim 20 \text{UI/ml}$ であり、
- TRAPタイプの作用薬に関して $5 \mu\text{M} \sim 200 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、
- トリプシンタイプの作用薬に関して $1 \text{nM} \sim 500 \text{nM}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \text{nM} \sim 300 \text{nM}$ であり、
- コラーゲンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 20 \mu\text{g/ml}$ であり、
- トロンボキサンA2タイプの作用薬に関して $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 5 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ であり、
- PAFタイプの作用薬に関して $0.005 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.05 \text{mg/ml} \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、
- イオノホアA23187タイプの作用薬に関して $0.1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項14】

凝集組成物中の弱い作用薬の濃度は：

- ADPタイプ、アドレナリンタイプ又はエピネフリンタイプの作用薬に関して $0.5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ であり、
- アラキドン酸タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{mM} \sim 5 \text{mM}$ であり、
- フォン・ヴィレブラント因子タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{mg/ml} \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、又は
- セロトニンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項15】

抗体は：抗CD9、抗CD32、抗PTA1、抗D42、抗GpIIb/IIIa又は抗GpIV抗体から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項16】

血液製剤は、赤血球を含むこと、及びステップ(a)の凝集処理は、レクチン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン(PVP)、ゼラチン、デキストラン又はポリエチレングリコール(PEG)から選択される少なくとも1つの凝着剤を含む凝着組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項1から15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

レクチンは、エリトロアグルチニン(erythroagglutinine)活性を有することを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

レクチンは、インゲンマメ、カラスノエンドウ、ソラマメ又はエリスリナ・コラロデンドロン、レンズマメ、アメリカヤマゴボウ、小麦胚芽(Triticum vulgare)のレクチンから選択されることを特徴とする請求項16又は17に記載の方法。

【請求項19】

凝着組成物中のインゲンマメのレクチンの濃度は、 $10 \mu\text{g/ml} \sim 800 \mu\text{g/ml}$ であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

凝着組成物中のポリエチレンイミンの濃度は、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、好ましくは20（重量／体積）％～40（重量／体積）％であることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 21】

ポリビニルピロリドン（PVP）は、PVP-40及びPVP-360を含む群から選択され、かつ好ましくは、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは4（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 22】

凝着組成物中のゼラチンは、好ましくは、0.5（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは40（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 23】

凝着組成物中のデキストランは：デキストラン70、デキストラン100、デキストラン500を含む群から選択され、好ましくは、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは4（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 24】

ポリエチレングリコールは：PEG8、PEG17、PEG35を含む群から選択され、好ましくは、0.05（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは20（重量／体積）％～40（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 25】

ステップ（c）の細胞溶解は：サポニン、SDS、ツイーン20、トリトンX100、Brij96、ポリドカノール、N-オクチルβ-D-グルコピラノシド、又は炭酸ナトリウムを含む群から選択される1つ又は幾つかの洗剤を含む溶解溶液によって行われることを特徴とする請求項1から24のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、生及び／又は死細菌の孢子であることを特徴とする請求項1から25のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

第1フィルタの孔の寸法は、2μm～20μmであることを特徴とする請求項1から26のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

第2フィルタの孔の寸法は、0.2μm～2μmであることを特徴とする請求項1から27のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、又は生及び／又は死細菌の孢子であること、第1フィルタの孔の寸法は、2μm～20μmであること、及び第2フィルタの孔の寸法は、0.2μm～2μmであることを特徴とする請求項1から28のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

ステップ（e）の汚染菌の検出は、密閉した装置中で行われることを特徴とする請求項2から29のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

請求項1から30のいずれかに記載の方法において利用され得る、血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌濃縮装置であって：

- 血液細胞の少なくとも1つの凝集剤及び場合により病原菌の少なくとも1つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第1タンク（1）、

10

20

30

40

50

- 血液細胞の少なくとも 1 つの溶解剤及び場合により病原菌の少なくとも 1 つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第 2 タンク (2)、
- 前記第 1 タンク中に形成された凝集体を留め置くことが可能な、第 1 及び第 2 タンクの間になれる第 1 フィルタ (3)、
- 汚染菌となり得るものを留め置くことが可能な、第 2 タンクの下流に置かれる第 2 フィルタ (4)、
- 第 1 タンク及び第 1 フィルタの間、第 1 フィルタ及び第 2 タンクの間、並びに第 2 タンク及び第 2 フィルタの間になれる密封かつ無菌の接続手段 (5) を含むことを特徴とする装置。

【請求項 3 2】

10

血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンクに連結するために、密封かつ無菌の接続 (6) を含むことを特徴とする請求項 3 1 に記載の装置。

【請求項 3 3】

血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンクに連結する、密封かつ無菌の前記接続は、逆止め弁 (7) を備えることを特徴とする請求項 3 2 に記載の装置。

【請求項 3 4】

所定の体積の血液製剤を、前記第 1 タンクに向けて前記製剤の貯蔵ポケットから直接、試料採取する手段を含むことを特徴とする請求項 3 1 又は 3 3 に記載の装置。

【請求項 3 5】

無菌の第 1 タンクは、試料吸入システム (8) を備えることを特徴とする請求項 3 6 又は 3 4 に記載の装置。 20

【請求項 3 6】

吸入システムは、ピストンであることを特徴とする請求項 3 5 に記載の装置。

【請求項 3 7】

第 2 フィルタは、フィルタを回収することを可能にする、分離され得る 2 つの部分から構成される膜支持体中に含まれることを特徴とする請求項 3 1 から 3 6 のいずれかに記載の装置。

【請求項 3 8】

密閉され、かつ無菌であることを特徴とする請求項 3 1 から 3 7 のいずれかに記載の装置。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液製剤又は派生製品中に場合により存在する病原菌の濃縮方法、並びに前記血液製剤の病原性検査を行うためにこのように濃縮された前記菌の検出を対象とする。

【0002】

血液製剤とは、全血、及びその分画から生じた、細胞成分を含む、又は含まないあらゆる製剤を意味し、例として、血液製剤とは、赤血球又は血小板の濃縮物を意味するが、血漿又は血清製剤も意味する。

【背景技術】

40

【0003】

細菌、ウイルス、カビ、酵母又はその他のような様々な病原菌による血液製剤及び派生製品の汚染検出は、現代において、公衆衛生に責任のある官庁、並びに輸血産業が直面する大きな問題の 1 つである。

【0004】

検出テストは存在するが、今日、それらは日常的に使用可能ではない。

【0005】

血液細胞の母集団又は分集団の中で、かかる病原菌を検出する大部分のテストによって示される主要な問題は、選択的に病原菌を引き出すとみなされる大部分の処理が、同時にそれらの除去を引き起こすことにある。

50

【 0 0 0 6 】

この除去は、テストした血液製剤中の前記菌の存在の過小評価に、かつそれ故に衛生上の危険増大にほぼ体系的に行き着く。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

従って出願人は、かかる病原菌による、血液製剤又は派生製品の汚染を検出するための迅速かつ高精度の新規方法を考え出した。

【 0 0 0 8 】

本発明による方法は、予備処理又は希釈なしに、被験者において採取された血液製剤から生じた試料に対して直接行われることにおいて注目すべきである。 10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

出願人が発達させた病原菌の検出方法は、前記病原菌を選択的に濃縮し、次に一旦濃縮されると、当業者に公知の技術によって、それらを検出することから本質的になる。

【 0 0 1 0 】

病原菌の選択的濃縮は、血液製剤の試料中に存在する血液細胞の様々な母集団の逐次又は同時除去によって行われる。

【 0 0 1 1 】

本発明による病原菌の濃縮方法は、血液細胞の選択的凝集により血液細胞の母集団の濃度を減少させることからなり、凝縮していない濃縮した病原菌を濾液中で採集し、かつ血液細胞の凝集体をフィルタ上に留め置くための濾過が後に続く、病原菌を濃縮する第1のステップを含む。 20

【 0 0 1 2 】

凝集とは、本発明の意味では、細胞凝縮体の形成に至らせるあらゆる作用を意味し、かつ細胞凝集体とは、2つ以上の細胞を含み、かつ寸法が単離細胞のそれよりも大きいあらゆる細胞集合を意味する。本発明の意味で、凝集体は、血小板活性化に続く血小板凝集のような凝集、赤血球が特殊な分子の存在下である際に得られる赤血球凝着のような凝着、又は細胞膜の静電荷の変化、又は2つ以上の細胞の再集合に至らせる他の細胞接着若しくは接近メカニズムによって生じた細胞接近によって得ることができる。 30

【 0 0 1 3 】

好ましい実施態様によれば、血液細胞の様々な母集団の凝集は、血小板の凝集をもたらす化合物を用いて、又は赤血球の特異な凝着をもたらす化合物を用いて行われ得る。

【 0 0 1 4 】

例えば、ある種の化合物の存在下で、血小板が、凝集する能力を有することが知られている。これらの凝集体は、濾過によって病原菌から容易に分離され得る。

【 0 0 1 5 】

赤血球は、幾つかの凝着性を同様に有する。

【 0 0 1 6 】

本発明による病原菌の濃縮方法は、第1の凝集ステップの際に凝集されなかった単離細胞を溶解させることからなる血液中の多数細胞、すなわち血小板及び赤血球の母集団の濃度を減少させる第2のステップを場合により含む。 40

【 0 0 1 7 】

血液細胞の母集団の濃度を減少させる、この第2のステップにより、血小板濃度に関して約4ログ (10^9 から 10^5 細胞 / ml へ) の、かつ赤血球濃度に関して約5ログ (10^{10} から 10^5 へ) の減少が可能になる。

【 0 0 1 8 】

より正確には、本発明は、血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の濃縮方法であって、次のステップ：

a) 前記血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を受けさせる、 50

b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第1フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ(a)で形成した凝集体を除去する、
c) ステップ(b)で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、
d) 細胞片を通す第2フィルタに、ステップ(c)の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収することを含むことを特徴とする方法を対象とする。

【0019】

好ましい実施態様によれば、本発明の方法は、場合により留め置かれる汚染菌を検出するために第2フィルタを分析する追加のステップを含む。

【0020】

好適には、本発明による検出方法は、ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際か、分析ステップ(e)の際、第2フィルタに直接、汚染菌のマーキング剤を添加することを含む。

10

【0021】

本発明の方法によって検出可能な病原菌のマーキング剤の例として、ChemChrome V6のようなエステラーゼ基質を含むマーキング溶液が挙げられる。

【0022】

同様に、本発明の方法によって検出可能な病原菌のマーキング剤として、マークした抗体又は核酸のマーカを含むマーキング溶液を使用することができる。好ましくは、マーカは、蛍光であるか、又は蛍光色素、若しくは蛍光にされる基質の分解を可能にする酵素に連結され、場合により蛍光は、レーザー励起によって検出される。

20

【0023】

本発明による検出方法は、方法のステップの少なくとも1つに、ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際か、分析ステップ(e)の際、第2フィルタに直接か、ステップの中の幾つかで、添加され得る、汚染菌の透過化処理剤の添加を同様に含む。

【0024】

汚染菌の透過化処理剤の例として、ポリエチレンイミン、二酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、単独の、又はナイシンと組み合わせたエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、並びにN-オクチルβ-D-グルコピラノシド、SDS、ツイーン、トリトン、Brj等のタイプの洗剤が挙げられる。

【0025】

本発明の方法の特殊な実施態様によれば、血液製剤の血液細胞は、血小板若しくは赤血球、又はそれらの混合物である。

30

【0026】

本発明の方法のもう1つの特殊な実施態様によれば、血液製剤の血液細胞は、血小板であり、かつステップ(a)の凝集処理は：

- 血小板抗原の特異性抗体、
- トロンビン、TRAP(トロンビンレセプタ活性化ペプチド)、トリプシン、コラーゲン、トロンボキサンA₂、PAF(血小板活性化因子)、イオノホアA₂₃₁₈₇から選択される強い血小板活性化作用薬、
- ADP、アドレナリン、アラキドン酸、フォン・ヴィレブラント因子、セロトニン又はエピネフリンから選択される弱い血小板活性化作用薬を含む群から選択される凝集剤の少なくとも1つを含む凝集組成物と試料を接触させることを含む。

40

【0027】

好適には、凝集組成物中の血小板抗原の特異なCD9タイプの抗体の濃度は、0.5 μg/ml ~ 100 μg/mlであり、かつ好ましくは、5 μg/ml ~ 40 μg/mlである。

【0028】

更に好適には、凝集組成物中の強い作用薬の濃度は：

- トロンビンタイプの作用薬に関して0.5 UI/ml ~ 100 UI/mlであり、かつ好ましくは、1 UI/ml ~ 20 UI/mlであり、

50

- T R A Pタイプの作用薬に関して $5 \mu\text{M} \sim 200 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \sim 100 \mu\text{M}$ であり、
- トリプシンタイプの作用薬に関して $1 \text{nM} \sim 500 \text{nM}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \text{nM} \sim 300 \text{nM}$ であり、
- コラーゲンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 20 \mu\text{g/ml}$ であり、
- トロンボキサンA2タイプの作用薬に関して $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 5 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.1 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ であり、
- P A Fタイプの作用薬に関して $0.005 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.05 \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、
- イオノホアA23187タイプの作用薬に関して $0.1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ である。

10

【0029】

好適には、凝集組成物中の弱い作用薬の濃度は：

- A D Pタイプ、アドレナリンタイプ又はエピネフリンタイプの作用薬に関して $0.5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ であり、
- アラキドン酸タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \sim 5$ であり、
- フォン・ヴィレブラント因子タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{mg/ml} \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、
- セロトニンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ である。

20

【0030】

全く好ましくは、血小板抗原の特異性抗体は：抗C D 9、C D 3 2、抗P T A 1、C D 4 2、抗G p I I b / I I I a 又は抗G p I V 抗体から選択される。

【0031】

本発明の方法のもう1つの特殊な実施態様によれば、血液製剤は、赤血球を含み、かつステップ(a)の凝集処理は、レクチン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン(P V P)、ゼラチン、デキストラン又はポリエチレングリコール(P E G)から選択される少なくとも1つの凝着剤を含む凝着組成物と試料を接触させることを含む。

30

【0032】

好適には、前記レクチンは、エリトロアグルチニン(e r y t h r o a g g l u t i n i n e) 活性を有する。

【0033】

非常に好ましくは、レクチンは、インゲンマメ、カラスノエンドウ、ソラマメ又はエリスリナ・コラロデンドロン、レンズマメ、アメリカヤマゴボウ、小麦胚芽(T r i t i c u m v u l g a r i s) のレクチンから選択される。

【0034】

好適には、凝着組成物中のインゲンマメタイプのレクチンの濃度は、 $10 \mu\text{g/ml} \sim 200 \mu\text{g/ml}$ である。

40

【0035】

好適には、凝着組成物中のポリエチレンイミンの濃度は、 0.1 (重量/体積) % ~ 40 (重量/体積) % である。

【0036】

非常に好ましくは、前記デキストランは、デキストラン70、デキストラン100、デキストラン500等から選択される。

【0037】

好適には、凝着組成物中のデキストランの濃度は、 0.1 (重量/体積) % ~ 40 (重量/体積) % である。

【0038】

50

非常に好ましくは、前記 P E G は、P E G 3 5、P E G 等から選択される。

【 0 0 3 9 】

好適には、凝着組成物中の P E G の濃度は、0 . 0 5 (重量 / 体積) % ~ 4 0 (重量 / 体積) % である。

【 0 0 4 0 】

好適には、凝着組成物中のゼラチンの濃度は、0 . 5 (重量 / 体積) % ~ 4 0 (重量 / 体積) % である。

【 0 0 4 1 】

非常に好ましくは、前記 P V P は、P V P - 4 0、P V P - 3 6 0 等から選択される。

【 0 0 4 2 】

好適には、凝着組成物中の P V P の濃度は、0 . 0 5 (重量 / 体積) % ~ 4 0 (重量 / 体積) % である。

【 0 0 4 3 】

好適には、ステップ (c) の細胞溶解は：サポニン、S D S、ツイーン 2 0、トリトン X 1 0 0、B r i j 9 6、ポリドカノール、N - オクチル β - D - グルコピラノシド、又は炭酸ナトリウムを含む群から選択される 1 つ又は幾つかの洗剤を含む溶解溶液によって行われる。

【 0 0 4 4 】

好ましくは、溶解溶液は、サポニン、トリトン X 1 0 0、及びツイーン 2 0 の混合物からなり、かつ非常に好ましくは、溶解溶液は、0 . 0 0 5 % ~ 0 . 5 % の (重量 / 体積 % で表す) 濃度を有するサポニン、0 . 0 0 1 % ~ 0 . 5 % の (重量 / 体積 % で表す) 濃度を有するトリトン X 1 0 0、0 . 0 1 % ~ 1 % の濃度を有するツイーン 2 0、0 . 1 % ~ 0 . 5 % の濃度を有する N - オクチル β - D - グルコピラノシドを含む。

【 0 0 4 5 】

好適には、細菌の透過化処理は：(グルコン酸、二酢酸) クロルヘキシジン、ポリエチレンイミン、N - オクチル β - D - グルコピラノシド、単独の、又は E D T A と組み合わせたナイシンを含む群から選択される 1 つ又は幾つかの反応体を含む溶液によって行われる。

【 0 0 4 6 】

好ましくは、透過化処理剤は、0 . 0 0 0 1 (重量 / 体積) % ~ 0 . 1 (重量 / 体積) % の濃度 (重量 / 体積) を有するクロルヘキシジン、5 μ g / m l ~ 1 2 0 μ g / m L の濃度を有するポリエチレンイミン、0 . 1 (重量 / 体積) % ~ 0 . 5 (重量 / 体積) % の濃度を有する N - オクチル β - D - グルコピラノシド、及び単独の、又は 1 m M ~ 1 0 m M の濃度を有する E D T A と組み合わせた、0 . 1 μ g / m L ~ 0 . 5 μ g / m L のナイシンに使用される。

【 0 0 4 7 】

本発明の方法は、血液製剤の多数の汚染菌を濃縮及び検出するために使用され得るが、それらの中で、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、生及び / 又は死細菌の胞子を挙げることができる。

【 0 0 4 8 】

好適には、本発明の方法で利用する第 1 フィルタの孔の寸法は、2 μ m ~ 2 0 μ m である。

【 0 0 4 9 】

好適には、本発明の方法で利用する第 2 フィルタの孔の寸法は、0 . 2 μ m ~ 2 μ m である。

【 0 0 5 0 】

好適には、本発明の方法のステップ (e) の汚染菌の検出は、密閉した装置中で行われる。

【 0 0 5 1 】

非常に好ましくは、本発明の方法により濃縮され得る汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、

10

20

30

40

50

カビ、酵母、又は生及び／又は死細菌の胞子の群から選択され、第1フィルタの孔の寸法は、 $2\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$ であり、かつ第2フィルタの孔の寸法は、 $0.2\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ である。

【0052】

本発明は：

- 血液細胞の少なくとも1つの凝集剤及び場合により病原菌の少なくとも1つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第1タンク(1)、
- 血液細胞の少なくとも1つの溶解剤及び場合により病原菌の少なくとも1つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第2タンク(2)、
- 前記第1タンク中に形成された凝集体を留め置くことが可能な、第1及び第2タンクの間に置かれる第1フィルタ(3)、
- 汚染病原菌となり得るものを留め置くことが可能な、第2タンクの下流に置かれる第2フィルタ(4)、
- 第1タンク(1)及び第1フィルタ(3)の間、第1フィルタ(3)及び第2タンク(2)の間、並びに第2タンク(2)及び第2フィルタ(4)の間に置かれる密封かつ無菌の接続手段(5)を含む、本発明の病原菌検出方法において利用され得る、血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の濃縮及びマーキング装置も対象とする。

【0053】

好ましい実施態様によれば、本発明の装置は、血液製剤を含むポケットを無菌の第1タンク(1)に連結するために、密封かつ無菌の接続手段(6)を含む。

【0054】

好適には、血液製剤を含むポケットを無菌の第1タンクに連結する、密封かつ無菌の接続(6)は、逆止め弁(7)を備える。

【0055】

もう1つの好ましい実施態様によれば、本発明の装置は、所定の体積の血液製剤を、前記第1タンク(1)に向かって前記製剤の貯蔵ポケットから直接試料採取する手段を含む。

【0056】

好適には、本発明の装置の密封かつ無菌の第1タンク(1)は、試料吸入システム(8)を備え、かつ好ましくは、前記吸入システムは、ピストンである。

【0057】

もう1つの好ましい実施態様によれば、本発明の装置の第2フィルタ(4)は、前記フィルタを回収することを可能にする、分離され得る2つの部分から構成される膜支持体中に含まれる。

【0058】

好適には、本発明の装置は、密閉され、かつ無菌である。

【0059】

本発明のその他の利点及び特徴は、以下に続く実施例及び添付図面を読めば、現れるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0060】

実験結果

【0061】

I. 凝集ステップによる病原菌の濃縮

【0062】

I. 1. 血小板凝集

【0063】

(実施例1)

強い作用薬：トロンビンによる凝集

【0064】

トロンビンは、血小板凝集の強い作用薬である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

本発明の枠内で出願人が行った実験作業において、トロンビン溶液（参照 T 8 8 8 5 S i g m a ）が：1 0 U I / テストの割合で使用される際に、1 0 0 U I / m l の濃度で、かつ 1 U I / テストの割合で使用される際に、希釈溶液（9 0 0 μ l の P B S 緩衝液を添加した 1 0 0 μ l のトロンビン原液）の形状で調製された。

【 0 0 6 6 】

トロンビンを介する血小板の凝集は、次のステップ：

- 2 0 μ l の P B S 緩衝液及び 2 0 μ l のトロンビンを添加する、1 6 0 μ l の血小板濃縮物を管中に置く、
- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 8 0 0 μ l の P B S 緩衝液を前記管に添加する、
- 管の中身を空隙率 1 1 μ m のフィルタで濾過する、
- 濾液から 1 / 2 0 ~ 1 / 1 0 の一連の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 で濾液の 1 0 0 μ l の各希釈溶液を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 膜に場合により留め置かれる血小板を計数することを含む。

10

【 0 0 6 7 】

以下の表 1 は、得られた結果を図示し、かつ 2 つの異なる濃度で使用するトロンビンの存在下で得られる血小板凝集体数を示し、かつ添付の図 1 は、これら結果をグラフによって図示する。

20

【 0 0 6 8 】

【 表 1 】

	対照	トロンビン 1 UI	トロンビン 10 UI
P C 6	1 5 8 4	3 7 4	
	1 5 3 5	4 9 0	
P C 6	2 6 2 2	1 3 5 8	4 4
	2 7 3 7	1 3 9 9	3 0

30

【 0 0 6 9 】

（実施例 2）

病原菌の存在下でのトロンビンによる血小板凝集

【 0 0 7 0 】

トロンビンの存在下での病原菌凝集を評価するために利用した実験作業は、次のステップ：

- 低温球体（c r y o s p h e r e）の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする、
- 1 6 0 μ l の血小板濃縮物に、2 0 μ l の大腸菌懸濁液及び 2 0 μ l のトロンビンを添加する、
- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 8 0 0 μ l の P B S 緩衝液を添加する、
- 空隙率 1 1 μ m のフィルタを通して濾過する、
- 一連の希釈：1 / 2 0 及び 1 / 1 0 及び 1 / 1 0、を行う、
- 膜 C B 0 4 で 1 0 0 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行うことを含む。

40

【 0 0 7 1 】

以下の表 2 は、大腸菌の存在下でのトロンビンによる血小板濃縮物の凝集を示す。

【 0 0 7 2 】

50

【表 2】

病原菌	血小板製剤	トロンビン	算出結果
大腸菌	—	—	1 9 2 1
	—	—	1 9 9 9
大腸菌	P C 6	—	6 5 7
			7 6 3
大腸菌	P C 6	1 U I	1 4 0
			1 6 7
大腸菌	P C 6	1 0 U I	1 0 9
			1 2 2

10

【0073】

トロンビン添加後、ほぼ即座に血塊が現れる。

【0074】

(実施例3)

弱い作用薬：ADPの存在下での血小板凝集

【0075】

ADP (SIGMA) を、蒸留水中に200 μMの濃度で使用する。

【0076】

ADPの存在下での血小板凝集を評価するために利用した実験作業は、次のステップ：

- 50 μlのPBS緩衝液及び50 μlのADPを添加する、400 μlの血小板濃縮物を管中に導入する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500 μlのPBS緩衝液をそこに添加する、
- 1/20及び1/10及び1/10の一連の希釈を行う、
- 膜CB04で100 μlの試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、及び
- 検出を行うことを含む。

30

【0077】

図1に図示した結果は、ADPの存在下で、血小板濃度が、約50%～約90%減少することを示す。

【0078】

(実施例4)

病原菌の存在下でのADPによる血小板凝集

【0079】

ADPの存在下での血小板凝集は、次のステップ：

- 低温玉(cryobille)の表皮ブドウ球菌を9mlの大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ37で18～24時間インキュベートする、
- 400 μlの血小板濃縮物に対し、50 μlの表皮ブドウ球菌懸濁液及び50 μlのADPを添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500 μlのPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率5 μmのフィルタで濾過を行う、
- 1/20及び1/10及び1/10の一連の希釈を行う、
- 膜CB04で100 μlの試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行うことを含む。

50

【 0 0 8 0 】

起こり得るトラッピング効果を増加させるように、病原菌を高濃度で植え付ける。ADPを $10\mu\text{M}$ の濃度で、血小板及び細菌に添加する。

【 0 0 8 1 】

【 表 3 】

病原菌	血小板製剤	凝集	結果	細菌濃度／ml
表皮ブドウ球菌	PC6	なし	590 605	$6.0\text{E}+07$
表皮ブドウ球菌	PC6	ADP $10\mu\text{M}$	492 441	$4.7\text{E}+07$

10

【 0 0 8 2 】

以上の表3に示す、得られた結果は、74%の細菌が、凝集ステップ後に回収されることを示している。

【 0 0 8 3 】

(実施例5)

CD9抗体の存在下での血小板凝集

【 0 0 8 4 】

CD9抗体が血小板の活性化、及び従ってその凝集をもたらすことは、公知である。記載するテストは、2つのCD9クローン、SN4クローン(Ancel、ref 156-020、濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$)及び6B1クローン(Hemosystem)により行った。

20

【 0 0 8 5 】

このCD9抗体によって利用される選択的凝集方法は、次のステップ：

- $400\mu\text{l}$ の血小板濃縮物に対し、 $50\mu\text{l}$ のPBS緩衝液及び $50\mu\text{l}$ のCD9抗体を添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- $500\mu\text{l}$ のPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率 $5\mu\text{m}$ のフィルタで濾過を行う、
- 1/20及び1/10及び1/10の一連の希釈を行う、
- 膜CB04で $100\mu\text{l}$ の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行うことを含む。

30

【 0 0 8 6 】

CD9抗体(SN4クローン)を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で、血小板の存在下で使用した。

【 0 0 8 7 】

添付の図2は、CD9抗体(SN4クローン)の存在下で得られた血小板凝集を図示する。

40

【 0 0 8 8 】

血小板凝集に必要なCD9抗体の最適濃度を評価するために、用量反応曲線を作成した。

【 0 0 8 9 】

方法：

- 管中に置かれる $400\mu\text{l}$ の血小板濃縮物に対し、CD9抗体の、0から $20\mu\text{g}/\text{ml}$ に及ぶ最終濃度を有する、抗体の様々な希釈溶液を添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- $500\mu\text{l}$ のPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率 $5\mu\text{m}$ のフィルタで濾過を行う、

50

- 一連の希釈：1 / 10 の4回の希釈を行う、
- 膜C B 0 4 で100 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行う。

【0090】

図3及び5は、漸増分量のCD9抗体（SN4クローン）の存在下で凝集した血小板の算出結果及びこのようにして得られる用量反応曲線をそれぞれ示す。

【0091】

残留血小板の算出は、アナライザによって行う。

【0092】

凝集は、用量依存性である。凝集効果を増大させるために、CD9濃度をできるだけ増加させた。しかしながら、細菌検出のために妥協点が定められ、約10 μ g / m l のCD9抗体の濃度を使用して、血小板濃度が、1から2ログに減少され得ることを決定した。

【0093】

（実施例5の2）

血小板凝集に必要なCD9抗体（6B1クローン）の最適濃度を評価するために、用量反応タイプの実験を確立した。

【0094】

方法：

- 管中に置かれる3 m l の血小板濃縮物に対し、CD9抗体の、2 . 5 μ g / m l から40 μ g / m l に及ぶ最終濃度を有する、抗体の様々な希釈溶液を添加する、
- 15分間、外界温度で管を撹拌する、
- 空隙率5 μ m のフィルタで濾過を行う、
- 上記のような血小板の計算を行う。

【0095】

添付の図4は、漸増分量のCD9抗体（6B1クローン）の存在下で凝集した血小板の算出結果を示す。

【0096】

（実施例6）

細菌の存在下でのCD9抗体による血小板凝集

【0097】

方法：

- 低温玉の表皮ブドウ球菌を大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ37 で18 ~ 24時間インキュベートする、
- 管中に置かれる400 μ l の血小板濃縮物に対し、50 μ l の表皮ブドウ球菌懸濁液及び50 μ l のCD9を添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500 μ l のPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率5 μ m のフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1 / 10 の4回の希釈を行う、
- 膜C B 0 4 で100 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行う。

【0098】

以下の表4は、細菌の存在下でのCD9による血小板凝集を図示する。

【0099】

【表4】

10

20

30

40

細菌		CD9	結果	回収率%
表皮ブドウ球菌	P C 1 0	— —	4 6 4 4	9 3
表皮ブドウ球菌	P C 1 0	+攪拌	4 3 4 8	
大腸菌	P C 1 0		2 1 8 2 4 3	6 4
大腸菌	P C 1 0	CD9+攪拌	1 6 6 1 4 8	

10

【 0 1 0 0 】

これらの結果は、表皮ブドウ球菌の細菌が、大いに回収されたことを示す。大腸菌に関し、算出は36%減少する。

【 0 1 0 1 】

I . 2 . 赤血球凝着

【 0 1 0 2 】

レクチンは、細胞を凝着させ、かつ/又は炭水化物複合体を沈殿させる、非免疫由来の糖タンパク質である。これらの分子は、一般に特異な炭水化物に結合される。

20

【 0 1 0 3 】

これらの実験作業の枠内で、次の2つのレクチンを使用した：

- P H A - E インゲンマメ
- カラスノエンドウ。

【 0 1 0 4 】

(実施例 1)

レクチンによる赤血球凝着

【 0 1 0 5 】

P H A - E インゲンマメレクチン (S i g m a) を、P B S 中で2 m g / m l の濃度で使用了。

30

【 0 1 0 6 】

V i c i a A c t i v a レクチン (S i g m a) を、1 m g / m l の濃度で使用了。

【 0 1 0 7 】

2つのレクチンの迅速な評価により、カラスノエンドウによる赤血球凝着がないことを確認することが可能になった。他方、インゲンマメは、急速かつ有効な凝着をもたらす。

【 0 1 0 8 】

方法：

- 4 0 0 μ l の赤血球を、5 0 μ l の P B S 及び5 0 μ l のインゲンマメを添加する、管中に置く、
- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、
- 5 0 0 μ l の P B S 緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率5 μ m のフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1 / 1 0 の4回の希釈を行う、
- 抗グリコホリン P E 抗体によりマーキングを行う、
- 検出を行う。

40

【 0 1 0 9 】

添付の図6は、インゲンマメの存在下で得られる赤血球凝着を示す。

【 0 1 1 0 】

このテストにおいて、インゲンマメは、2 0 0 μ g / m l の濃度で使用了。

【 0 1 1 1 】

50

インゲンマメの存在下で、赤血球濃度の 2 ログの再現可能な減少が観察される。

【 0 1 1 2 】

(実施例 2)

細菌の存在下での赤血球凝着

【 0 1 1 3 】

予備テストは、インゲンマメレクチン及び細菌の間に相互作用がないことを示している。

【 0 1 1 4 】

方法

低温玉の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする、

10

- 管中で、4 0 0 μ l の P B S、5 0 μ l の大腸菌 (純粋培養) 及び 5 0 μ l のインゲンマメを混合する、

- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、

- 5 0 0 μ l の P B S 緩衝液をそこに添加する、

- 5 μ m のフィルタで濾過を行う、

- 一連の希釈：1 / 1 0 の 4 回の希釈を行う、

- 膜 C B 0 4 で 1 0 0 μ l の試料を濾過する、

- エステラーゼマーキングを行う、

- 検出を行う。

【 0 1 1 5 】

20

2 0 0 μ g / m l のインゲンマメの濃度を使用して得られた結果を、以下の表 5 に図示する。

【 0 1 1 6 】

【 表 5 】

細菌	赤血球	レクチン (濃度)	算出	回収率%
大腸菌 NCTC9001	RBC9		6 6 2 6 0 4	
大腸菌 NCTC9001	RBC9	インゲンマメ 2 0 0 μ g / m l	5 4 4 5 7 9	9 1

30

【 0 1 1 7 】

これらの結果は、9 1 % の細菌が凝着ステップ後に検出されること、及びこの凝着ステップ後に、赤血球濃度が 2 ログ減少し、他方大腸菌株がなおも良く回収されることを示す。

【 0 1 1 8 】

II . 溶解ステップによる病原菌濃縮

【 0 1 1 9 】

本発明の枠内で、出願人は、分析する試料中に場合により存在する細菌の濃度に影響を及ぼすことなく血液細胞の除去を可能にする様々な選択的溶解技術の開発を行った。

40

【 0 1 2 0 】

幾つかの予めの調査に続き、出願人は、幾つかの細菌がトリトン X 1 0 0 のような洗剤の存在下で耐性を有することを確認し、かつ細菌回収率が最適である、最適洗剤濃度を決定した。

【 0 1 2 1 】

(実施例 1)

純粋細菌培養に対する溶解溶液の配合の効果

【 0 1 2 2 】

方法：

50

- 株は、9 ml の大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ 37 で 18 ~ 24 時間インキュベートする、
- 一連の希釈 (1 / 10) を 10^{-5} まで P B S 緩衝液中で行った、
- 1 ミリリットルの最終希釈溶液を、9 ml の溶解溶液 (0 . 0 1 (重量 / 体積) % のサポニン、0 . 1 (重量 / 体積) % のツイーン及び 0 . 0 0 1 (重量 / 体積) % のトリトン X 1 0 0 によって 15 分間処理する、
- 膜 C B 0 4 で 1 0 0 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを添付書類 1 に掲載される情報により行う、
- 検出を行う。

【 0 1 2 3 】

これら様々な試験の結果を、以下の表 6 に図示する。表 6 に、得られた様々な細菌回収率を表す。

【 0 1 2 4 】

【 表 6 】

株	対照	溶解した試料	回収率%
大腸菌	1 3 2 1 4 5	1 5 3 1 1 9	9 8
セレウス菌	4 6 5 5 7 2	6 1 5 4	1 1
大腸菌	5 2 5 4	4 4 4 4	8 3
表皮ブドウ球菌	2 9 5 2 3 0 6 9	3 0 3 4 3 0 2 0	1 0 1
エンテロバクター アエロゲネス	8 4 1 8 0 2	8 8 0 9 2 5	1 1 0
緑膿菌	2 6 1 2 1 5	8 2 6 6	3 1
黄色ブドウ球菌	1 0 5 9 4	1 2 6 1 2 2	1 2 5
プロテウス菌 (<i>P. mirabilis</i>)	7 2 9 9 0 6	1 1 2 9 1 1 5 1	1 3 9
ネズミチフス菌	6 0 8 6 0 0	8 2 0 7 8 7	1 3 3
霊菌	1 8 4 8 1 7 7 5	1 8 2 6 1 8 6 0	1 0 2
<i>C. amycolatum</i>	1 1 0 3 1 1 6 7	1 5 1 2 2 0 3 5	1 5 6
肺炎桿菌	7 2 8 2	7 9 7 3	9 9
蛍光菌	4 0 3 9 3 9 5 1	4 8 7 3 5 1 0 5	1 2 5
ウシ連鎖球菌	3 0 7 4 2 9 3 9	1 8 4 8 1 9 7 8	6 4
エンテロコリチカ菌	1 0 2 1 8 1 0 3 2 1	9 8 8 8 1 0 5 2 6	9 9

【 0 1 2 5 】

これらの結果は、添付の図 7 に図示する。

【 0 1 2 6 】

大部分の株は、溶解溶液によって影響を及ぼされない：回収率は、緑膿菌及びセレウス菌を除き、所定の予測と一貫性があり、95～115%である。

【 0 1 2 7 】

(実施例 2)

血小板中に植え付けた細菌に対する溶解溶液の配合の効果

【 0 1 2 8 】

汚染のシミュレーションを行うように、2つの株を血小板濃縮物中で増加するようにした。

【 0 1 2 9 】

方法

- セレウス菌及び黄色ブドウ球菌株を、20 ml の血小板中の 10^5 の細胞の濃度を使用して、50 ml の管中の血小板中に植え付けた、
- これらの50 ml の管は、血小板インキュベータ中に22℃で数日間、保存する、
- 1 ミリリットルの植え付けた血小板を、9 ml の溶解溶液によって希釈する、
- 15 分間、外界温度で溶解を行う、
- 膜 C B 0 4 7 で $100 \mu\text{l}$ の試料を濾過する、
- 添付書類 1 に示すように、細菌をステアリン基質によってマークする、
- 膜をアナライザで走査する。

【 0 1 3 0 】

溶解後の細菌の算出結果を以下の表 7 に図示する。

【 0 1 3 1 】

【表 7】

	対照	溶解
セレウス菌	16	14
	24	27
	細菌/ml 2.0E+06	2.1E+06
黄色ブドウ球菌	1966	1885
	2046	1901
	細菌/ml 2.0E+08	1.9E+08

【 0 1 3 2 】

細菌は、 5×10^3 細胞 / ml の最初の濃度で植え付け、かつ約 $10^6 \sim 10^9$ 細胞 / ml の濃度で数日後に検出する。

【 0 1 3 3 】

これらの実験の結果、血小板中で発育した細菌は、溶解溶液によって影響を及ぼされなかったということになる。

【 0 1 3 4 】

(実施例 2 b)

純粋細菌培養に対する溶解溶液の配合の効果

【 0 1 3 5 】

方法

- 株は、9 ml の大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ37℃で18～24時間インキュベートする、
- エステラーゼマーキングによる細菌数の決定後に、3000の細菌を3 ml の P B S 中に接種する、
- 3 ml を、溶解溶液 (N O G 0.25%～2%) で20分間処理する、
- 膜 C B 0 4 で試料全体を濾過する、

- 固相血球計算法で算出を行う。

【0136】

得られた結果を添付の図11に図示する。

【0137】

(実施例3)

赤血球に対する溶解組成物の配合の効果

【0138】

方法：

- 1ミリリットルの赤血球を、9mlの溶解溶液、又は9mlのPBS中で希釈する（対照）、

10

- 15分間、外界温度で溶解を行う、

- 細胞カウンタを用いて溶解した又は溶解しない試料を分析する。

【0139】

図9は、溶解しない赤血球製剤に対する溶解した赤血球製剤で得られた結果を示す。

【0140】

(実施例4)

血小板に対する溶解組成物の配合の効果

【0141】

溶解溶液の効率の再現性をテストした。血小板の異なる試料を溶解し、かつ分析した。

【0142】

20

方法：

- 1ミリリットルの血小板を、9mlの溶解溶液中で希釈する、

- 15分間、外界温度で溶解を行う、

- 一連の希釈（1/10）を 10^{-5} までPBS緩衝液中で行った、

- 膜CB04で100 μ lの試料を濾過する、

- エステラーゼ基質によって微生物をマークする、

- 膜をアナライザで走査する。

【0143】

添付の図8は、様々な血小板試料によって得られた溶解の結果を図示する。

【0144】

30

III. 2つの凝集及び溶解ステップによる病原菌濃縮

【0145】

2つのステップでの病原菌濃縮による試料調製は：

1) 血液製剤の特異な細胞凝集又は凝着、

2) 血液製剤の特異な細胞溶解を含む。

【0146】

(実施例1)

特異な血小板分離

【0147】

方法：

40

- 低温玉の大腸菌を9mlの大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ37℃で18～24時間インキュベートする。

【0148】

第1凝集ステップは、次のように行われる：

- 1mlの血小板濃縮物、50 μ lの大腸菌（純粋培養）及び100 μ lのCD9を管中で混合する、

- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する。

【0149】

第2溶解ステップが、その次に行われる：

- 900 μ lの溶解緩衝液を、凝集後に100 μ lの濾液に添加する、

50

- 15 分間、外界温度で全体を維持する、
- 一連の希釈：1 / 10 の 4 回の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 でこのようにして得た 1 0 0 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼ基質によって細菌及び血小板のマーキングを行う（添付書類 1 ）、
- アナライザによって細菌及び血小板を算出する。

【0150】

細菌濃縮方法を 2 つのステップで行って得られる結果を以下の表 8 に図示する。

【0151】

【表 8】

細菌	血小板濃縮物 (PC)	凝集剤		細菌算出	細菌回収率 %
大腸菌 NCTC9001	PC			337 313	
大腸菌 NCTC9001	PC		溶解	302 256	86%
大腸菌 NCTC9001	PC	CD9		266 161	66%
大腸菌 NCTC9001	PC	CD9	溶解	157 138	45%

10

20

【0152】

（実施例 2）

特異な赤血球分離

【0153】

方法：

- 低温玉の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 37 で 18 ~ 24 時間インキュベートする。

【0154】

凝着ステップは、次のように行われる：

- 1 m l の赤血球、50 μ l の大腸菌（純粋培養）及び 125 μ l のレクチンを管中で混合する、
- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、
- 空隙率 5 μ m のフィルタで濾過を行う。

30

【0155】

第 2 溶解ステップが、その次に行われる：

- 900 μ l の溶解緩衝液を、凝着後、100 μ l の濾液に添加する、
- 15 分間、外界温度で全体を維持する、
- 一連の希釈：1 / 10 の 4 回の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 でこのようにして得た 1 0 0 μ l の試料を濾過する、
- エステラーゼ基質によって細菌の、かつ抗グリコホリン P E 抗体によって赤血球のマーキングを行う（添付書類 2 ）、
- アナライザによって細菌及び血小板を算出する。

40

【0156】

以下の表 9 は、溶解ステップが後に続く、レクチンによる赤血球の凝着ステップ後に行われる細菌算出によって得られる結果を示す。

【0157】

【表 9】

				細菌算出	細菌回収率 (%)	赤血球算出
大腸菌 NCTC 9001	赤血球10			441 449		3582 4188
大腸菌 NCTC 9001	赤血球10	レクチン	溶解	261 348	68	161 180

【0158】

10

凝着後、赤血球濃度は、1.5ログ減少した。

【0159】

この2つのステップの後に、68%の細菌を回収した。

【0160】

IV. マーキング剤

【0161】

(実施例1)

エステラーゼ基質 ChemChrome V6

【0162】

マーキング溶液は、次の手順に従い、エステラーゼ基質から調製され、かつ本発明の検出方法において使用され得る。 20

a) 調製

- 緩衝液 ChemSol B16、1ミリリットル当たり10 μ lのエステラーゼ基質 ChemChrome V6 (膜当り500 μ lのマーキング溶液)
- この溶液は、4 で光を避けて最大4時間、保存する。

b) 使用

マーキング緩衝液を直径33mmのペトリ皿に導入する。
緩衝液に対し、500 μ lのマーキング溶液を配分する。
濾過斜面に膜CB04を置く。分析する100 μ lの試料で濾過する。
緩衝液上に膜を置く。

30

15分間37 でインキュベートする。

【0163】

(実施例2)

マークされた抗体

【0164】

同様に、マークされた抗体を含むマーキング溶液は、次の手順に従い、本発明の検出方法において使用され得る

- 90 μ lの試料の希釈溶液を採取する、
- 10 μ lの抗グリコホリンPE抗体を添加する、
- 15分間、外界温度で光を避けて渦を作り、かつインキュベートする、
- 900 μ mのPBS緩衝液を添加する、
- 濾過斜面中に膜CB04を置く、
- 分析する100 μ lの溶液を真空濾過する、
- アナライザの1次及び3次ケーブルを逆にしてアナライザ中で膜を分析する。

40

【0165】

(実施例3)

マーカの浸透を改良するための細菌透過処理剤の添加の重要性

【0166】

方法：

- 株は、9mlの大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ37 で18~24時 50

間インキュベートする、

- エステラーゼマーキングによる細菌数の決定後に、3000の細菌を3mLの血小板濃縮物中に接種する、
- 3mLを、1mLの凝集溶液(CD9:6B1クローン:30μg/mL、Pico green 1/2000、PEI 40μg/mL~80μg/mL)で40分間処理する、
- 試料を空隙率5μmのフィルタを通して濾過する、
- 試料は、溶解溶液(クロルヘキシジン 5×10^{-3} %、NOG 0.5 %、ナイシン0.2μg/mL、EDTA 5mM)中で20分間インキュベートする、
- 膜CB04で試料全体を濾過する、
- 固相血球計算アナライザで算出を行う。

10

【0167】

V. 結論

【0168】

最良の病原菌調製条件に到達するための技術的選択が、実験作業により定義された。

【0169】

血小板濃縮物に関して、これらの技術的選択は：

- 1) 例えばCD9のような血小板活性化抗体による凝集ステップ、
- 2) サボニン、ツイーン20及びトリトンX100のような洗剤の組み合わせによる細胞溶解ステップを含む。

20

【0170】

赤血球濃縮物に関して：

- 1) 例えばインゲンマメのようなレクチンによる凝着ステップ、
- 2) サボニン、ツイーン20及びトリトンX100のような洗剤の組み合わせによる細胞溶解ステップを含む。

【0171】

病原菌のマーキング及び透過化処理は、凝集ステップの際、溶解ステップの際、又は直接、分析前に最終フィルタ上に濃縮された菌に対して、一様に介在し得る。

【図面の簡単な説明】

【0172】

30

【図1】血小板濃縮物を様々な濃度のトロンピンと接触させた後の血小板の算出を図示する。

【図2】2つの血小板試料に関し、ADPの存在下での凝集後の血小板の算出を図示する。

【図3】4つの血小板試料に関し、CD9抗体(SN4クローン)の存在下での血小板の算出を示す。

【図4】3mLの血小板濃縮物に対して使用する、漸増分量のCD9抗体(6B1クローン)の存在下での血小板の算出結果を示す。

【図5】増加する濃度のCD9抗体(SN4クローン)の存在下で得られる用量反応曲線を示す。

40

【図6】3つの赤血球濃縮物試料に関し、200μg/mLの濃度で使用するインゲンマメレクチンの存在下での赤血球の凝着を図示する。

【図7】純粋培養中の様々な病原菌の回収に対する溶解溶液の効果を示す。

【図8】2つの血小板試料の血小板計算に対する溶解溶液の効果を示す。

【図9】赤血球濃縮物の異なる2つの試料の赤血球計算に対する溶解の効果を図示する。

【図10】マーカの浸透を増加させるための透過化処理剤としてポリエチレンイミン(PEI)を使用した、血小板試料中の大腸菌細菌の算出を図示する。

【図11】純粋細菌培養に対する溶解溶液中のN-オクチルβ-D-グルコピラノシドの濃度の効果を図示する。

【図12】-密封かつ無菌の第1タンク(1)、-密封かつ無菌の第2タンク(2)、-

50

第1タンク(1)及び第2タンク(2)の間に置かれる無菌の第1フィルタ(3)、-第2タンク(2)の下流に置かれる無菌の第2フィルタ(4)、-第1タンク(1)及び第1フィルタ(3)の間、第1フィルタ(3)及び第2タンク(2)の間、並びに第2タンク(2)及び第2フィルタ(4)の間に置かれる密封かつ無菌の接続手段(5)、-血液製剤を含むポケットを第1タンク(1)に連結するための、密封かつ無菌の接続手段(6)、-血液製剤を含むポケットを第1タンク1に連結する、接続(6)中に置かれる逆止め弁(7)、-試料吸入システム(8)を含む本発明の病原菌の濃縮装置の特殊な実施を図示する。

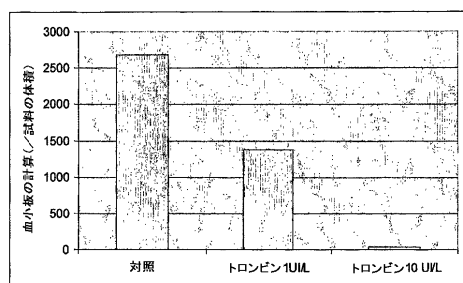
【符号の説明】

【0173】

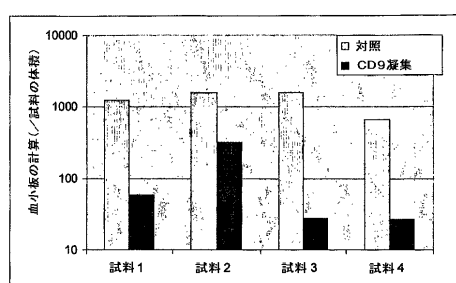
- 1 第1タンク
- 2 第2タンク
- 3 第1フィルタ
- 4 第2フィルタ
- 5 接続手段
- 6 接続手段
- 7 逆止め弁
- 8 試料吸入システム

10

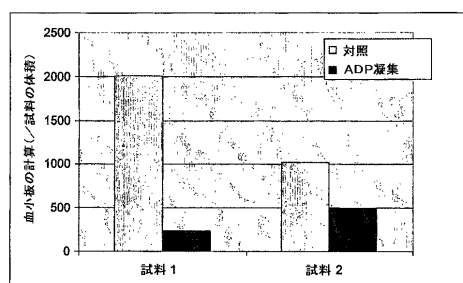
【図1】



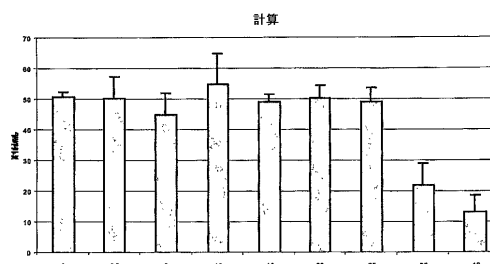
【図3】



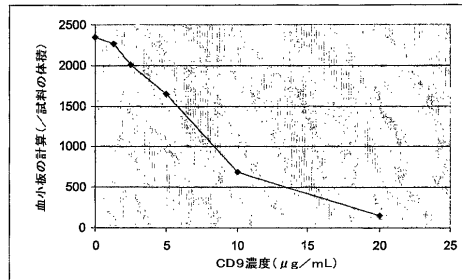
【図2】



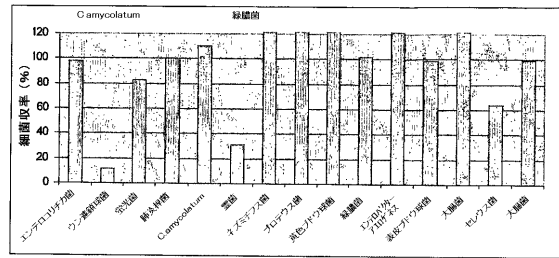
【図4】



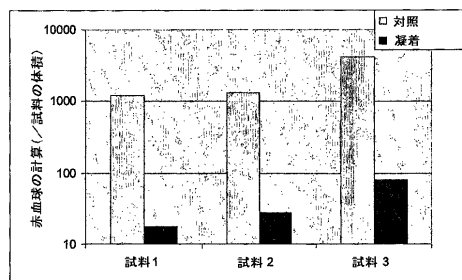
【 図 5 】



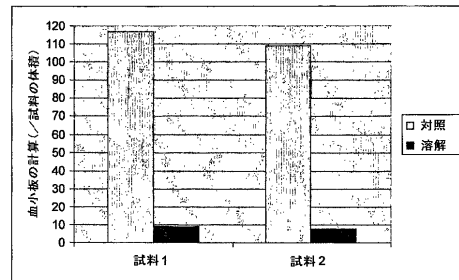
【圖 7】



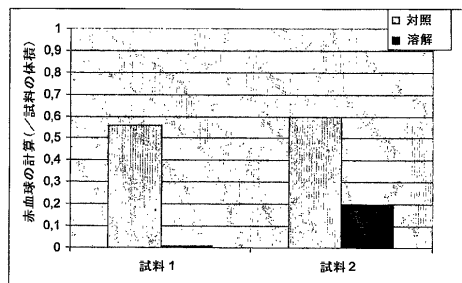
【 図 6 】



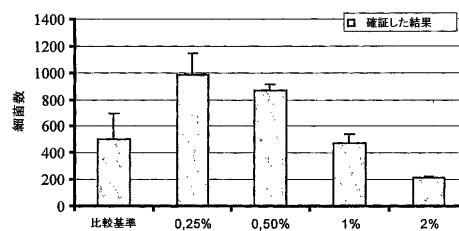
【 図 8 】



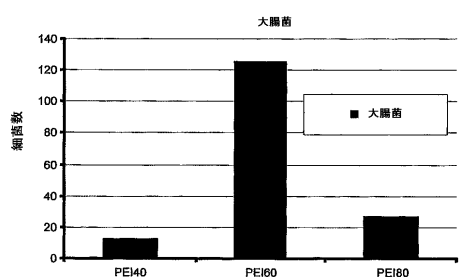
【 図 9 】



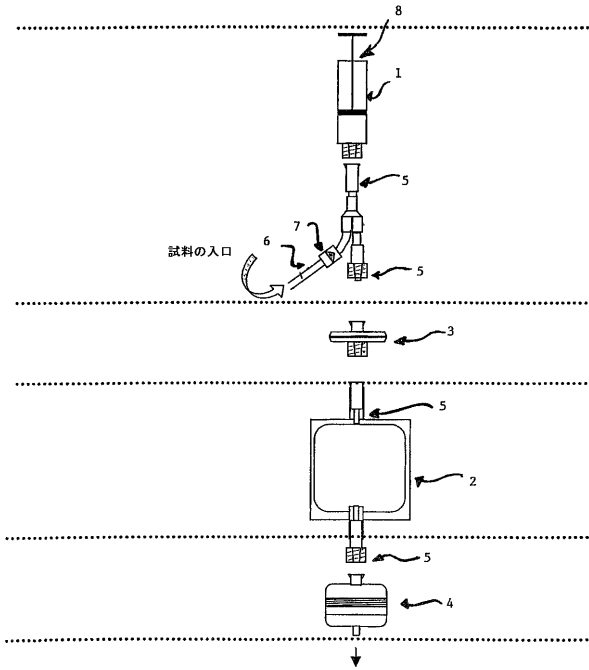
【 図 1 1 】



【 図 1 0 】



【図 12】



【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
27 mars 2003 (27.03.2003)

PCT

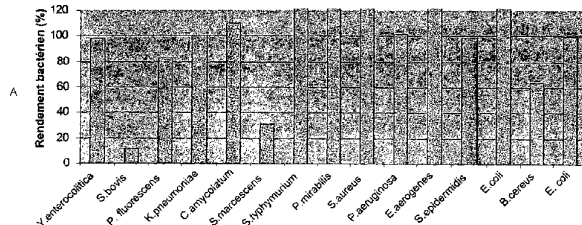
(10) Numéro de publication internationale
WO 03/025207 A1(51) Classification internationale des brevets¹ : C12Q 1/04,
C12M 1/12(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03132(22) Date de dépôt international :
13 septembre 2002 (13.09.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/11873 13 septembre 2001 (13.09.2001) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
HEMOSYSTEM [FR/TR]; 45, cours Goulle, F-13006
Marseille (FR).(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HER-
MET, Jean-Pierre [FR/FR]; 4ter, avenue Charles de
Gaulle, F-92100 Boulogne (FR). BESSON-FAURE,
Isabelle [FR/FR]; Villa les Troènes, Promenade Pierre
Blancard, F-13400 Aubagne (FR). RIBAUT, Sébastien
[FR/TR]; Résidence Chantecote, Avenue du Général de
Gaulle, F-13380 Plan de Cuques (FR). GODFRIN, Yann
[FR/FR]; 5, rue Emile Dupont, F-69009 Lyon (FR). MON-
NOT DES ANGES, Anne [FR/FR]; 6, quai Bellevue,
F-71100 Saint Rémy (FR).(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Broese-Majewicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).(81) États désignés (national) : A1, AG, AI, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR CONCENTRATION AND DETECTION OF PATHOGENIC GERMS FROM BLOOD
PRODUCTS AND/OR THEIR DERIVATIVES(54) Titre : DISPOSITIF ET PROCÉDÉ DE CONCENTRATION ET DE DÉTECTION DE GERMES PATHOGENES A PARTIR
DE PRODUITS SANGUINS ET/OU DE LEURS DERIVES

A... BACTERIAL YIELD (%)

(57) Abstract: The invention concerns a device and a method for concentrating pathogenic germs potentially present in blood prod-
ucts or derivatives and for detecting said germs comprising the following steps: (a) subjecting a sample of said blood product to a
blood cell aggregating treatment, (b) eliminating the aggregates formed at step (a) by passing the treated sample over a first filter
allowing through the contaminating germs but not the cell aggregates, (c) selectively lysing the residual cells of the filtrate obtained
at step (b), (d) recuperating the contaminating germs by passing the lysate of step (c) over a second filter to detect the contaminating
germs possibly trapped.

[Suite sur la page suivante]



WO 03/025207 A1

WO 03/025207 A1



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Publiée :
avec rapport de recherche internationale

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GII, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un dispositif et une méthode de concentration de germes pathogènes éventuellement présents dans les produits sanguins ou dérivés, ainsi que la détection desdits germes comprenant les étapes suivantes, (a) on soumet un échantillon dudit produit sanguin à un traitement d'aggrégation des cellules sanguines, (b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a) par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre laissant passer les germes contaminants mais pas les agrégats de cellules, (c) on lyse sélectivement les cellules résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b), (d) on récupère les germes contaminants par passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre laissant passer les débris cellulaires, et (e) on analyse le second filtre pour détecter les germes contaminants éventuellement retenus.

WO 03/025207

PCT/FR02/03132

DISPOSITIF ET PROCEDE DE CONCENTRATION ET DE DETECTION DE GERMES PATHOGENES
A PARTIR DE PRODUITS SANGUINS ET/OU DE LEURS DERIVES

5 La présente invention a pour objet une méthode
de concentration de germes pathogènes éventuellement
présents dans les produits sanguins ou dérivés, ainsi que
la détection desdits germes ainsi concentrés pour effectuer
un contrôle de la pathogénicité desdits produits sanguins.

10 On entend par produit sanguin tant le sang
total, comme toute préparation issue du fractionnement de
celui-ci, comprenant ou non des composants cellulaires, à
titre d'exemple, on entend par produit sanguin les
15 concentrés des globules rouges ou de plaquettes, mais aussi
les préparations plasmatiques ou sériques.

 La détection de contaminations des produits
sanguins et dérivés par différents germes pathogènes, tels
20 que des bactéries, des virus, des moisissures, des levures
ou autres, est l'une des grandes difficultés auxquelles
sont confrontées de nos jours les autorités responsables de
la santé publique, ainsi que les industries de la
transfusion sanguine.

25 Des tests de détection existent, mais ils ne
sont pas utilisables en routine à ce jour.

 Les principales difficultés présentées par la
plupart des tests de détection de tels germes pathogènes,
30 parmi une population ou une sous-population de cellules
sanguines, réside dans le fait que la plupart de
traitements censés extraire sélectivement les germes
pathogènes, provoquent simultanément une élimination de
ceux-ci.

Cette élimination conduit presque systématiquement à une sous-évaluation de la présence desdits germes dans le produit sanguin testé, et donc à une augmentation du risque sanitaire.

5 La demanderesse a donc conçu une nouvelle méthode rapide et sensible pour détecter une contamination d'un produit sanguin ou dérivé, par de tels germes pathogènes.

10 Le procédé selon l'invention est remarquable en ce qu'il est réalisé directement sur un échantillon issu d'un produit sanguin prélevé chez un sujet, sans traitement ou dilution préliminaire.

15 Le procédé de détection de germes pathogènes développée par la Demanderesse consiste essentiellement à concentrer sélectivement lesdits germes pathogènes, puis à les détecter, une fois concentrés, par des techniques connues de l'homme du métier.

20 La concentration sélective des germes pathogènes est effectuée par élimination séquentielle ou simultanée des différentes populations de cellules sanguines présentes dans un échantillon d'un produit sanguin.

25 Le procédé de concentration de germes pathogènes selon l'invention comporte une première étape de concentration des germes pathogènes consistant à réduire la concentration des populations des cellules sanguines au moyen d'une agrégation sélective de celles-ci, suivie d'une filtration afin de recueillir dans le filtrat les germes pathogènes concentrés non agrégés et de retenir sur le
30 filtre les agrégats de cellules sanguines.

On entend par agrégation, au sens de la présente invention, toute action conduisant à la formation d'agrégats cellulaires, et on entend par agrégat cellulaire

5 tout groupement de cellules comportant plus de deux
cellules et dont la taille est supérieure à celle d'une
cellule isolée. Au sens de la présente invention, un
agrégat peut être obtenu soit par agrégation, telle que
l'agrégation des plaquettes subséquente à leur activation,
une agglutination, telle que l'agglutination des globules
rouges obtenue lors que ceux-ci se trouvent en présence de
molécules particulières, soit un rapprochement des cellules
induit par un changement de la charge électrostatique de
10 leurs membranes ou encore d'autres mécanismes d'adhésion ou
de rapprochement cellulaire conduisant au regroupement de
plus de deux cellules.

15 Selon des modes de mise en œuvre préférés,
l'agrégation des différentes populations de cellules
sanguines peut être effectuée à l'aide de composés
induisant l'agrégation plaquettaire, ou bien à l'aide de
composés induisant l'agglutination spécifique des globules
rouges.

20 On connaît par exemple que, en présence de
certains composés, les plaquettes ont la capacité de
s'agréger. Ces agrégats peuvent être facilement séparés des
germes pathogènes par filtration.

25 Les globules rouges présentent également
quelques propriétés d'agglutination.

Le procédé de concentration de germes
pathogènes selon l'invention comporte éventuellement une
deuxième étape de réduction de la concentration des
30 populations des cellules majoritaires dans le sang, à
savoir les plaquettes et les globules rouges, consistant à
lyser les cellules isolées non agrégées lors de la première
étape d'agrégation.

WO 03/025207

PCT/FR02/03132

4

Cette deuxième étape de réduction de la concentration des populations des cellules sanguines permet une réduction de l'ordre de 4 log (depuis 10^9 à 10^5 cellules/ml) en ce qui concerne la concentration des plaquettes et de l'ordre de 5 log (depuis 10^{10} à 10^5) en ce qui concerne la concentration des globules rouges.

Plus précisément l'invention a pour objet un procédé de concentration de germes contaminants éventuellement présents dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) on soumet un échantillon dudit produit sanguin à un traitement d'agrégation des cellules sanguines,

b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a) par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre laissant passer les germes contaminants mais pas les agrégats de cellules,

c) on lyse sélectivement les cellules résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b),

d) on récupère les germes contaminants par passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre laissant passer des débris cellulaires.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire d'analyse du second filtre pour détecter les germes contaminants éventuellement retenus.

Avantageusement le procédé de détection selon l'invention comprend l'addition d'un agent de marquage des germes contaminants, soit lors de l'agrégation de l'étape

WO 03/025207

5

PCT/FR02/03132

(a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e) d'analyse.

A titre d'exemple d'agent de marquage des germes pathogènes détectables par le procédé de l'invention, on peut citer une solution de marquage comprenant un substrat estérasiq

Aussi, en tant d'agent de marquage des germes pathogènes détectables par le procédé de l'invention, on peut utiliser une solution de marquage comprenant un anticorps marqué ou un marqueur d'acides nucléiques. Préférentiellement, le marqueur sera fluorescent ou couplé à un fluorochrome ou à un enzyme permettant la dégradation d'un substrat rendu ainsi fluorescent, éventuellement la fluorescence sera détectée par une excitation laser.

Le procédé de détection selon l'invention comprend également l'addition d'un agent de perméabilisation des germes contaminants, qui peut être ajouté à au moins l'une des étapes du procédé, soit lors de l'agrégation de l'étape (a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e) d'analyse, soit à plusieurs d'entre elles.

A titre d'exemple d'agent de perméabilisation des germes contaminants, on peut citer le polyéthylènimine, le diacétate de chlorhexidine, le digluconate de chlorhexidine, l'acide d'éthylène diamine tetracétate (EDTA) seul ou en combinaison avec la nisine ainsi que les détergents de type N-Octyl β -D-glucopyranoside, SDS, Tween, triton, Brij, etc.

Selon un mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit

WO 03/025207

6

PCT/FR02/03132

sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

5 Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le

10 groupe comprenant :

- un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,
- un agoniste fort de l'activation plaquettaire, choisi parmi : la thrombine, le TRAP (thrombin receptor activating peptide), la trypsine, le
- 15 collagène, le thromboxane A₂, le PAF (platelet activating factor), le ionophore A23187.
- un agoniste faible de l'activation plaquettaire, choisi parmi ADP, adrénaline, acide
- 20 arachidonique, facteur Von Willebrand, sérotonine ou épinéphrine.

 Avantageusement la concentration en anticorps de type CD9 spécifique d'un antigène plaquettaire dans la

25 composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 100 µg/ml, et de préférence elle est comprise entre 5 µg/ml et 40 µg/ml.

 Encore avantageusement, la concentration en agoniste fort dans la composition d'agrégation est comprise

30 entre :

- 0,5 UI/ml et 100 UI/ml et de préférence entre 1 UI/ml et 20 UI/ml pour un agoniste de type thrombine,

WO 03/025207

PCT/FR02/03132

7

- 5 μ M et 200 μ M et de préférence entre 10 et 100 μ M pour un agoniste de type TRAP,

- 1 nM et 500 nM et de préférence entre 10 nM et 300 nM pour un agoniste de type trypsine,

5 - 0,05 μ g/ml et 50 μ g/ml et de préférence entre 1 μ g/ml et 20 μ g/ml pour un agoniste de type collagène,

- 0,01 μ g/ml et 5 μ g/ml et de préférence entre 0,1 et 1 μ g/ml pour un agoniste du type thromboxane A₂,

10 - 0,005 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,05 et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type PAF,

- 0,1 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M et 20 μ M pour un agoniste du type ionophore A23187.

15 Avantageusement la concentration en agoniste faible dans la composition d'agrégation est comprise entre :

- 0,5 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M et 20 μ M pour un agoniste du type ADP, du type adrénaline ou du type épinéphrine.

20 - 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre 0,01 et 5 pour un agoniste du type acide arachidonique,

- 0,001 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,01 mg/ml et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type facteur Von Willebrand,

25 - 0,05 μ M et 100 μ M et de préférence entre 0,01 μ M et 50 μ M pour un agoniste du type sérotonine.

30 D'une manière tout à fait préférentielle l'anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire, est choisi parmi : un anticorps anti-CD9, CD32, anti-PTA1, CD42, anti-GpIIb/IIIa ou anti-GpIV.

Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, le produit sanguin

comprend des globules rouges et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent d'agglutination choisi parmi les lectines, le
5 polyéthylènimine, le polyvinylpyrrolidone (PVP), les gélatines, les dextrans ou les polyéthylènes glycols (PEG).

Avantageusement lesdites lectines présentent une activité érythroagglutinine.

10 Tout préférentiellement les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* ou *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgaris*.

Avantageusement la concentration de lectine de
15 type *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 µg/ml et 200 µg/ml.

Avantageusement la concentration de
20 polyéthylènimine dans la composition d'agglutination, est comprise entre 0.1% (poids/volume) et 40% (poids/volume)

Tout préférentiellement lesdits dextrans sont choisis parmi le Dextran 70, Dextran 100, Dextran 500, etc.

Avantageusement la concentration de dextran
25 dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.1% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Tout préférentiellement lesdits PEG sont choisis parmi les PEG35, PEG, etc.

Avantageusement la concentration de PEG dans la
30 composition d'agglutination est comprise entre 0.05% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Avantageusement la concentration de gélatine dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.5% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Tout préférentiellement lesdites PVP sont choisies parmi les PVP-40, PVP-360, etc.

Avantageusement la concentration de PVP dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.05% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Avantageusement, la lyse des cellules de l'étape (c) est réalisée avec une solution de lyse comprenant un ou plusieurs détergents choisis dans le groupe comprenant : saponine, SDS, Tween 20, Triton X100, Brij 96, Polidocanol, N-Octyl β -D-glucopyranoside ou Carbonate de sodium.

De préférence, la solution de lyse est constituée d'un mélange de saponine, de Triton X100 et de Tween 20, et tout préférentiellement la solution de lyse comprend de la saponine à une concentration (exprimée en % poids/volume) comprise entre 0,005% et 0,5%, du Triton X100 à une concentration (exprimée en % poids/volume) comprise entre 0,001% et 0,5% du Tween 20 à une concentration comprise entre 0,01% et 1%, du N-Octyl β -D-glucopyranoside à une concentration comprise entre 0,1% et 0,5%.

Avantageusement, la perméabilisation des bactéries est réalisée avec une solution comprenant un ou plusieurs réactifs choisis dans le groupe comprenant : Chlorhexidine (digluconate, diacétate), Polyéthylènimine, N-Octyl β -D-glucopyranoside, Nisin seule ou en combinaison avec de l'EDTA.

De préférence, les agents perméabilisants sont utilisés pour la chlorhexidine à une concentration (poids/volume) comprise entre 0,0001% (poids/volume) et 0,1% (poids/volume), pour le polyéthylènimine une

WO 03/025207

10

PCT/FR02/03132

concentration comprise entre 5 µg/ml et 120 µg/mL, pour le N-Octyl βD-glucopyranoside à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 0,5% (poids/volume) et pour la Nisin entre 0.1 µg/mL et 0,5 µg/mL seule ou en combinaison avec de l'EDTA à une concentration comprise entre 1 mM et 10 mM.

Le procédé de l'invention peut être utilisé pour concentrer et détecter de nombreux germes contaminants des produits sanguins, parmi lesquels on peut citer des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures, des spores de bactéries vivantes et/ou mortes.

Avantageusement la taille des pores du premier filtre mis en œuvre dans le procédé de l'invention est comprise entre 2 µm et 20 µm.

Avantageusement la taille des pores du second filtre mis en œuvre dans le procédé de l'invention est comprise entre 0,2 µm et 2 µm.

Avantageusement la détection des germes contaminants de l'étape (e) du procédé de l'invention est réalisée dans un dispositif clos.

Tout préférentiellement, les germes contaminants capables d'être concentrés selon le procédé de l'invention, sont choisis parmi le groupe des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures ou des spores de bactéries vivantes et/ou mortes, la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 µm et 20 µm, et la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 µm et 2 µm.

L'invention a aussi pour objet un dispositif pour la concentration et le marquage des germes contaminants éventuellement présents dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines, susceptible d'être mis en œuvre dans le procédé de détection de germes pathogènes de l'invention comprenant :

- un premier réservoir (1) étanche et stérile contenant au moins un agent d'agrégation de cellules sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

- un deuxième réservoir (2) étanche et stérile contenant au moins un agent de lyse de cellules sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

- un premier filtre (3) placé entre le premier et le deuxième réservoir capable de retenir les agrégats formés dans ledit premier réservoir,

- un deuxième filtre (4) placé en aval du deuxième réservoir capable de retenir les éventuels germes pathogènes contaminants,

- des moyens de connexion (5) étanches et stériles placés, entre le premier réservoir (1) et le premier filtre (3), entre le premier filtre (3) et le deuxième réservoir (2) et entre le deuxième réservoir (2) et le deuxième filtre (4).

Selon un mode de mise en œuvre préféré, le dispositif de l'invention comprend des moyens de connexion (6) étanches et stériles pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir (1) stérile.

Avantageusement, la connexion (6) étanche et stérile reliant la poche contenant le produit sanguin au

WO 03/025207

12

PCT/FR02/03132

premier réservoir stérile est munie d'une valve anti-retour (7).

5 Selon un autre mode de réalisation préférée, le dispositif de l'invention comprend des moyens d'échantillonnage d'un volume déterminé du produit sanguin directement à partir d'une poche de stockage dudit produit vers ledit premier réservoir (1).

10 Avantageusement, le premier réservoir (1) étanche et stérile du dispositif de l'invention est muni d'un système d'aspiration (8) de l'échantillon, et de préférence ledit système d'aspiration est un piston.

15 Selon un autre mode de mise en œuvre préféré, le deuxième filtre (4) du dispositif de l'invention est inclus dans un support de membrane composé de deux parties pouvant être dissociées permettant de récupérer ledit filtre.

20 Avantageusement le dispositif de l'invention est clos et stérile.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et des figures en annexe dans lesquelles :

25 - la figure 1 illustre le dénombrement des plaquettes après avoir mis en contact les concentrés plaquettaires avec différentes concentrations de thrombine.

- La figure 2 illustre le dénombrement des plaquettes après agrégation en présence d'ADP pour 2 échantillons plaquettaires.

30 - La figure 3 montre le dénombrement des plaquettes en présence d'anticorps CD9 (clone SN4) pour 4 échantillons plaquettaires.

- La figure 4 montre les résultats du dénombrement des plaquettes en présence de doses

croissantes d'anticorps CD9 (clone 6B1) utilisé sur 3 mL de concentré plaquettaire.

- La figure 5 montre la courbe dose réponse obtenue en présence de concentrations croissantes d'anticorps CD9 (clone SN4).

- La figure 6 illustre l'agglutination de globules rouges en présence de la lectine *Phaseolus vulgaris* utilisée à une concentration de 200 µg/ml pour 3 échantillons de concentrés de globules rouges.

- La figure 7 montre les effets de la solution de lyse sur la récupération de différents germes pathogènes dans des cultures pures.

- La figure 8 montre l'effet de la solution de lyse sur la numération plaquettaire de deux échantillons de plaquettes.

- La figure 9 illustre l'effet de la lyse sur la numération érythrocytaire de deux échantillons différents de concentrés de globules rouges.

- La figure 10 illustre le dénombrement des bactéries *Escherichia coli* au sein d'un échantillon plaquettaire en utilisant le polyéthylène imine (PEI) en tant qu'agent perméabilisant pour augmenter la pénétration du marqueur.

- La figure 11 illustre l'effet de la concentration en N-octyl β D-glucopyranoside dans la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

- La figure 12 illustre une mise en œuvre particulière du dispositif de concentration des germes pathogènes de l'invention, comprenant:

- un premier réservoir (1) étanche et stérile,
- un deuxième réservoir (2) étanche et stérile,
- un premier filtre stérile (3) placé entre le premier réservoir (1) et le deuxième réservoir (2),

- un deuxième filtre stérile (4) placé en aval du deuxième réservoir (2)

- des moyens de connexion (5) étanches et stériles placés, entre le premier réservoir (1) et le premier filtre (3), entre le premier filtre (3) et le deuxième réservoir (2) et entre le deuxième réservoir (2) et le deuxième filtre (4).

- des moyens de connexion (6) étanches et stériles pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir (1).

- une valve anti-retour (7) placée dans la connexion (6) reliant la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir 1.

- un système d'aspiration de l'échantillon (8).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN D'UNE ETAPE D'AGREGATION

I.1 Agrégation des plaquettes.

Exemple 1 . Agrégation avec un agoniste fort: la thrombine.

La thrombine est un agoniste fort de l'agrégation plaquettaire.

Dans les travaux expérimentaux menés par la Demanderesse dans le cadre de la présente invention, des solutions de thrombine (référence T8885 Sigma) ont été préparées : à une concentration de 100 UI/ml lorsqu'elle est utilisée à raison de 10 UI/test et sous forme de solution diluée (100 µl de solution mère de thrombine additionnée de 900 µl de tampon PBS), lorsqu'elle est utilisée à raison de 1 UI/test.

L'agrégation des plaquettes par l'intermédiaire de la thrombine comporte les étapes suivantes :

WO 03/025207

15

PCT/FR02/03132

- On place dans un tube 160 µl de concentré plaquettaire auxquels on ajoute 20 µl de tampon PBS et 20 µl de thrombine
- On agite manuellement les tubes durant 5 minutes à température ambiante.
- On ajoute audits tubes 800 µl de tampon PBS.
- On filtre le contenu des tubes sur un filtre de porosité 11 µm.
- On effectue des dilutions en série 1/20 à 1/10 à partir des filtrats.
- On filtre 100 µl de chaque dilution du filtrat sur une membrane CB04.
- On effectue un marquage estérasique.
- On compte les plaquettes éventuellement retenues sur la membrane.

Le tableau 1 ci-dessous illustre les résultats obtenus et représente le nombre d'agrégats plaquettaires obtenus en présence de thrombine utilisée à deux concentrations différentes et la figure 1 en annexe illustre graphiquement ces résultats.

Tableau 1

	Contrôle	Thrombine 1 UI	Thrombine 10 UI
PC 6	1584	374	
	1535	490	
PC 6	2622	1358	44
	2737	1399	30

25

Exemple 2: Agrégation des plaquettes avec de la thrombine en présence de germes pathogènes.

Les travaux expérimentaux mis en œuvre afin d'évaluer l'agrégation des germes pathogènes en présence de thrombine comportent les étapes suivantes :

30

WO 03/025207

16

PCT/FR02/03132

- Une cryosphère de *E. Coli* est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

5 - On ajoute à 160 µl de concentré plaquettaire 20 µl de la suspension de *E.coli* et 20µl de thrombine.

- on agite manuellement le tube durant 5 minutes à température ambiante.

- On ajoute 800 µl de tampon PBS,

10 - On filtre à travers un filtre de porosité 11 µm,

- on effectue des dilutions en série : 1/20 et 1/10 et 1/10,

- On filtre 100 µl de l'échantillon, sur une membrane CB04

15 - On effectue un marquage estérasiq

- On effectue la détection.

20 Le tableau 2 ci-dessous montre l'agrégation des concentrés plaquettaires avec de la thrombine en présence de *E.coli*.

Tableau 2

Germes pathogènes	Préparation Plaquettes	Thrombine	Résultats Dénombrement
<i>E. coli</i>	-	-	1921
	-	-	1999
<i>E. coli</i>	PC 6	-	657
			763
<i>E. coli</i>	PC 6	1 UI	140
			167
<i>E. coli</i>	PC 6	10 UI	109
			122

25 Après addition de la thrombine, un caillot apparaît presque instantanément.

Exemple 3: Agrégation des plaquettes en présence d'un agoniste faible: l'ADP.

De l'ADP (SIGMA) est utilisé à une concentration de 200 μ M dans de l'eau distillée.

Les travaux expérimentaux mis en œuvre afin d'évaluer l'agrégation des plaquettes en présence d'ADP comportent les étapes suivantes :

- On introduit dans un tube 400 μ l de concentré plaquettaire, auxquels on additionne 50 μ l de tampon PBS et 50 μ l d'ADP,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante,

- On y ajoute 500 μ l de tampons PBS,

- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10

- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04,

- On effectue un marquage estérasiq, et

- On effectue la détection.

Les résultats illustrés sur la figure 1 montrent que, en présence d'ADP, la concentration de plaquettes est réduite d'environ 50% à environ 90%.

Exemple 4 : Agrégation plaquettaire avec de l'ADP en présence de germes pathogènes.

L'agrégation des plaquettes en présence d'ADP comporte les étapes suivantes :

- Une cryobille de *Staph epidermidis* est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

WO 03/025207

18

PCT/FR02/03132

- Sur 400 µl de concentré plaquettaire on ajoute 50 µl de la suspension de *Staph epidermidis* et 50 µl d'ADP,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm,

- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10,

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04

- On effectue un marquage estérasique,

- On effectue la détection.

Les germes pathogènes sontensemencés à une concentration élevée de manière à augmenter un possible effet de piégeage. L'ADP est ajouté aux plaquettes et aux bactéries à une concentration de 10 µM.

Tableau 3

Germe pathogène	Préparation plaquettaire	Agrégant	Résultats	Concentration bactéries/ml
<i>Staph. epidermidis</i>	PC 6	néant	590 605	6,0E+07
<i>Staph. epidermidis</i>	PC 6	ADP 10µM	492 441	4,7E+07

Les résultats obtenus, représentés sur le Tableau 3 ci-dessus montrent que 74% de bactéries sont récupérées après l'étape d'agrégation

Exemple 5 : Agrégation des plaquettes en présence d'un anticorps CD9.

Il est connu que l'anticorps CD9 induit l'activation des plaquettes et par conséquent leur agrégation. Les tests décrits ont été réalisés avec deux clones CD9, le clone SN4 (Ancel, ref 156-020, concentration 100 µg/ml) et le clone 6B1 (Hemosystem).

Le procédé d'agrégation sélective mis en œuvre avec cet anticorps CD9 comporte les étapes suivantes :

- Sur 400 µl de concentré plaquettaire on ajoute 50 µl de tampon PBS et 50 µl d'anticorps CD9,
- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante
- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,
- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm
- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10,
- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04,
- On effectue un marquage estérasique,
- On effectue la détection.

L'anticorps CD9 (clone SN4) a été utilisé en présence des plaquettes à une concentration finale de 10 µg/ml.

La figure 2 en annexe illustre l'agrégation des plaquettes obtenue en présence d'anticorps CD9 (clone SN4).

Afin d'évaluer la concentration optimale de l'anticorps CD9 nécessaire pour l'agrégation plaquettaire, une courbe dose-réponse a été établie.

Méthode :

WO 03/025207

20

PCT/FR02/03132

- Sur 400 µl de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute différentes dilutions d'anticorps, avec des concentrations finales allant de 0 à 20 µg/ml en anticorps CD9.

5 - Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm

10 - On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04

- On effectue un marquage estérasique,

15 - On effectue la détection

Les figures 3 et 5 montrent respectivement les résultats du dénombrement des plaquettes agrégées en présence de doses croissantes d'anticorps CD9 (clone SN4) et la courbe dose-réponse ainsi obtenue.

20 Le dénombrement des plaquettes résiduelles est effectué avec l'Analyseur.

L'agrégation est dose-dépendante. Pour augmenter l'effet d'agrégation, la concentration en CD9 a été augmentée autant que possible. Cependant un compromis a été établi pour la détection des bactéries, et l'on a déterminé que la concentration plaquettaire peut être réduite de 1 à 2 Log en utilisant une concentration d'environ 10 µg/ml d'anticorps CD9.

30 Exemple 5 bis :

Afin d'évaluer la concentration optimale de l'anticorps CD9 (clone 6B1) nécessaire pour l'agrégation

WO 03/025207

21

PCT/FR02/03132

plaquettaire, une expérience du type dose-réponse a été établie

Méthode :

5 - Sur 3 mL de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute différentes dilutions d'anticorps, avec des concentrations finales allant de 2,5 µg/mL à 40 µg/mL en anticorps CD9.

- Les tubes sont agités durant 15 minutes à température ambiante

10 - On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm

- On effectue la numération des plaquettes comme décrit ci-dessus.

15 La figure 4 en annexe montre les résultats du dénombrement des plaquettes agrégées en présence de doses croissantes d'anticorps CD9 (clone 6B1).

Exemple 6 : Agrégation plaquettaire avec l'anticorps CD9 en présence de bactéries.

20 Méthode :

- Une cryobille de Staph epidermidis est introduite dans un tube de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

25 - Sur 400 µl de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute 50 µl de la suspension de Staph epidermidis et 50 µl de CD9,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

30 - On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

WO 03/025207

22

PCT/FR02/03132

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04

- On effectue un marquage estéril.

- On effectue la détection

5

Le tableau 4 ci-dessous illustre l'agrégation des plaquettes avec du CD9 en présence de bactéries.

Tableau 4

Bactéries		CD9	Résultat	% de récupération
Staph.epidermidis	PC 10	-	46	93
		-	44	
Staph.epidermidis	PC 10	+ Agitation	43	93
			48	
E. coli	PC 10		218	64
			243	
E. coli	PC 10	CD 9 + Agitation	166	64
			148	

10

Ces résultats montrent que les bactéries Staph epidermidis ont été bien récupérées. Pour E.Coli le dénombrement est réduit de 36%.

15

I.2. Agglutination de globules rouges.

Les lectines sont des glycoprotéines d'origine non-immune qui agglutinent les cellules et/ou précipitent des complexes carbohydrates. Ces molécules se lient couramment à des carbohydrates spécifiques.

20

Dans le cadre de ces travaux expérimentaux, deux lectines ont été utilisées :

- Phaseolus vulgaris PHA-E

- Vicia Sativa

Exemple 1 : Agglutination de globules rouges avec des lectines.

La lectine Phaseolus vulgaris PHA-E (Sigma) a été utilisée à une concentration de 2 mg/ml dans du PBS.

5 La lectine Vicia Activa (Sigma) a été utilisée à la concentration de 1 mg/ml.

Une évaluation rapide des deux lectines a permis de vérifier qu'il n'y a pas d'agglutination des globules rouges avec Vicia sativa. D'autre part Phaseolus
10 vulgaris induit une agglutination rapide et efficace.

Méthode :

- 400 µl de globules rouges sont placés dans des tubes auxquels on ajoute 50 µl de PBS et 50 µl de
15 Phaseolus vulgaris,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm,
20

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On effectue un marquage avec un anticorps anti-glycophorine-PE.

25 - On effectue la détection

La figure 6 en annexe montre l'agglutination des globules rouges obtenue en présence de Phaseolus vulgaris.

30 Dans ce test, Phaseolus vulgaris a été utilisée à une concentration de 200 µg/ml.

On observe une diminution reproductible de deux logs de la concentration en globules rouges en présence de Phaseolus vulgaris.

Exemple 2 : Agglutination de globules rouges en présence de bactéries.

Les tests préliminaires ont montré qu'il n'y a pas d'interaction entre la lectine Phaseolus et les bactéries.

Méthode

Une cryobille de E.coli est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

- On mélange dans des tubes, 400 µl de PBS, 50 µl de E.coli (culture pure) et 50 µl de Phaseolus vulgaris,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de 5 µm,

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10,

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04,

- On effectue un marquage estérasique,

- On effectue la détection.

Les résultats obtenus, en utilisant une concentration Phaseolus vulgaris de 200µg/ml sont illustrés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

Bactéries	Globules rouges	Lectine (Concentration)	Dénombrement	% récupération
E. coli	RBC 9		662	
NCTC 9001			604	
E. coli	RBC 9	Phaseolus	544	
NCTC 9001		200 µg/ml	579	91

Ces résultats montrent que 91% des bactéries sont détectées après l'étape d'agglutination et qu'après cette étape d'agglutination, la concentration en globules rouges est réduite de deux logs alors que la souche E. coli est encore bien récupérée.

II. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN D'UNE ETAPE DE LYSE.

Dans le cadre de la présente invention, la demanderesse a effectué une mise au point des différentes techniques de lyse sélective permettant l'élimination des cellules sanguines sans affecter la concentration des bactéries éventuellement présentes dans les échantillons à analyser.

Suite à quelques études préalables, la Demanderesse a constaté que certaines bactéries sont résistantes en présence de détergents tels que le Triton X100 et a déterminé la concentration optimale de détergents avec laquelle le pourcentage de récupération de bactéries est optimal.

Exemple 1 : Effet de la formulation de la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

Méthode

- Les souches sont conservées dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubées à 37 °C durant 18-24 heures.

- Des dilutions en série (1/10) ont été effectuées dans du tampon PBS jusqu'à 10^{-5}

- Un millilitre de la dernière dilution est traité avec 9 ml de la solution de lyse (0,01% (poids/volume) de saponine, 0,1% (poids/volume) de Tween et 0,001% (poids/volume) Triton X 100 durant 15 minutes

- 100 µl de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB04

- Un marquage estérasique est effectué selon les indications figurant en annexe 1

5 - On effectue la détection.

10 Les résultats de ces différents essais sont illustrés dans le tableau 6 ci-dessous, dans lequel sont exprimés les différents pourcentages de récupération des bactéries obtenus.

Tableau 6

Souche	Contrôle	Échantillon lysé	% de récupération
<i>E. coli</i>	132 145	153 119	98
<i>Bacillus cereus</i>	465 572	61 54	11
<i>E. coli</i>	52 54	44 44	83
<i>Staph. epidermidis</i>	2952 3069	3034 3020	101
<i>E. aerogenes</i>	841 802	880 925	110
<i>Ps. aeruginosa</i>	261 215	82 66	31
<i>Staph. aureus</i>	105 94	126 122	125
<i>P. mirabilis</i>	729 906	1129 1151	139
<i>S. typhimurium</i>	608 600	820 787	133
<i>Serratia marcescens</i>	1848 1775	1826 1860	102
<i>C. amycolatum</i>	1103 1167	1512 2035	156
<i>K. pneumoniae</i>	72 82	79 73	99
<i>P. fluorescens</i>	4039 3951	4873 5105	125
<i>Streptococcus bovis</i>	3074 2939	1848 1978	64
<i>Y. enterocolitica</i>	10218 10321	9888 10526	99

WO 03/025207

27

PCT/FR02/03132

Ces résultats sont illustrés sur la figure 7 en annexe.

La plupart des souches ne sont pas affectées par la solution de lyse: les pourcentages de récupération sont cohérents avec les prévisions prédéfinies, entre 95 et 115%, sauf pour *Ps. aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Exemple 2 : Effet de la formulation de la solution de lyse sur les bactériesensemencées dans des plaquettes.

De manière à simuler une contamination, deux souches ont été adaptées à la croissance dans des concentrés plaquettaires.

Méthode

- Les souches *Bacillus cereus* et *Staph. aureus* ont été ensemencées dans des plaquettes dans des tubes de 50 ml en utilisant une concentration de 10^5 cellules dans 20 ml de plaquettes.

- Ces tubes de 50 ml sont conservés dans l'incubateur de plaquettes à 22 °C durant plusieurs jours,

- Un millilitre de plaquettes ensemencées est dilué avec 9 ml de la solution de lyse,

- La lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante,

- 100 µl de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB047,

- Les bactéries sont marquées avec un substrat stéarique comme indiqué en annexe 1,

- La membrane est balayée avec l'Analyseur.

Les résultats du dénombrement des bactéries après la lyse sont illustrés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7

	Contrôle	Lysés
Bacillus cereus	16	14
	24	27
bactéries/ml	2,0E+06	2,1E+06
Staph. aureus	1966	1885
	2046	1901
bactéries/ml	2,0E+08	1,9E+08

Les bactéries ont étéensemencées à une concentration initiale de $5 \cdot 10^3$ cellules/ml et sont détectées plusieurs jours plus tard à des concentrations de l'ordre de 10^6 à 10^9 cellules /ml.

Il en résulte de ces expériences, que les bactéries qui se sont développées dans les plaquettes n'ont pas été affectées par la solution de lyse.

Exemple 2b : Effet de la formulation de la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

Méthode

- Les souches sont conservées dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubées à 37 °C durant 18-24 heures.

- Après détermination du nombre de bactéries par marquage estérasique, 3000 bactéries sont inoculées dans 3 mL de PBS

- Les 3mL sont traités avec la solution de lyse (NOG 0.25% à 2%) pendant 20 minutes

- La totalité de l'échantillon est filtrée sur une membrane CB04

- Le dénombrement est effectué en cytométrie en phase solide

Les résultats obtenus sont illustrés figure 11 en annexe.

Exemple 3 : Effet de la formulation de la composition de lyse sur les globules rouges.

Méthode

- Un millilitre de globules rouges est dilué dans 9 ml de solution de lyse ou 9 ml de PBS (contrôle).
- la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante
- les échantillons lysés ou non sont analysés à l'aide d'un compteur cellulaire.

La figure 9 montre les résultats obtenus sur la préparation de globules rouges lysée par rapport à une préparation de globules rouges non lysée.

Exemple 4 : Effet de la formulation de la composition de lyse sur les plaquettes.

La reproductibilité de l'efficacité de la solution de lyse a été testée. Des échantillons différents de plaquettes ont été lysés et analysés.

Méthode:

- Un millilitre de plaquettes est dilué dans 9 ml de solution de lyse
- la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante
- Des dilutions en série (1/10) ont été effectuées dans du tampon PBS jusqu'à 10^{-5}
- 100 µl de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB04.
- les microorganismes sont marqués avec un substrat estérasiq
- la membrane est balayée avec l'analyseur.

La figure 8 en annexe illustre les résultats de la lyse obtenue avec différents échantillons de plaquettes.

III. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN DE DEUX ETAPES D'AGREGATION ET DE LYSE.

La préparation de l'échantillon par concentration des germes pathogènes en deux étapes comprend :

- 1) L'Agrégation ou agglutination spécifique des cellules du produit sanguin.
- 2) La Lyse spécifique des cellules du produit sanguin.

Exemple 1: Séparation spécifique des plaquettes

Méthode :

- Une cryobille de E.coli est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

La première étape d'agrégation est effectuée comme suit :

- On mélange dans des tubes, 1 ml de concentré plaquettaire, 50 µl de E.coli (culture pure) et 100 µl de CD 9,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante.

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

- On ajoute 900 µl de tampon de lyse à 100 µl du filtrat après agrégation,

- On maintient l'ensemble 15 minutes à température ambiante,

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On filtre 100 µl de l'échantillon ainsi obtenu sur une membrane CB04,

WO 03/025207

31

PCT/FR02/03132

- On effectue un marquage des bactéries et des plaquettes avec un substrat estérasique (Annexe 1)

- On dénombre les bactéries et les plaquettes avec l'Analyseur.

5

Les résultats obtenus en effectuant le procédé de concentration des bactéries en deux étapes sont illustrés dans le tableau 8 ci-dessous.

10

Tableau 8

bactéries	Concentré plaquettaire (PC)	Agent agrégant		Dénombrement bactéries	% récupération bactéries
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC			337 313	
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC		Lyse	302 256	86%
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC	CD9		266 161	66%
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC	CD9	Lyse	157 138	45%

Exemple 2. Séparation spécifique des globules rouges.

15

Méthode :

- Une cryobille de *E.coli* est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

L'étape d'agglutination est effectuée comme

20

suit :

- On mélange dans des tubes, 1 ml de globules rouges, 50 µl de *E.coli* (culture pure) et 125 µl de lectine,

25

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

WO 03/025207

32

PCT/FR02/03132

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm.

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

5 - On ajoute 900 µl de tampon de lyse à 100 µl du filtrat après agglutination,

- On maintient l'ensemble 15 minutes à température ambiante,

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

10 - On filtre 100 µl de l'échantillon ainsi obtenu sur une membrane CB04,

- On effectue un marquage des bactéries avec un substrat estérasique et des globules rouges avec un anticorps anti-Glycophorine-PE (Annexe 2)

15 - On dénombre les bactéries et les globules rouges avec l'Analyseur.

20 Le tableau 9 ci-dessous montre les résultats obtenus avec le dénombrement des bactéries effectué après l'étape d'agglutination des globules rouges avec la lectine suivie de l'étape de lyse.

Tableau 9

				Dénombrement des bactéries	récupération des bactéries (%)	Dénombrement des globules rouges
<i>E. coli</i> NCTC 9001	Globules rouges 10			441 449		3582 4188
<i>E. coli</i> NCTC 9001	Globules rouges 10	Lectine	Lyse	261 348	68	161 180

Après agglutination la concentration en globules rouges a été réduite de 1,5 log.

Soixante-huit (68) % des bactéries sont récupérées après ces deux étapes.

5

IV. AGENTS DE MARQUAGE

Exemple 1. Substrat estérasique ChemChrome V6

Des solutions de marquage peuvent être préparées à partir d'un substrat estérasique et utilisées dans le procédé de détection de l'invention selon le protocole suivant

a) Préparation

- 10 µl du substrat estérasique ChemChrome V6 par millilitre de tampon ChemSol B16 (500 µl de solution de marquage par membrane)

- cette solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière au maximum 4 heures.

b) Utilisation

Introduire un tampon de marquage dans une boîte de Pétri de 33 mm de diamètre.

Distribuer 500 µl de la solution de marquage sur le tampon.

Placer la membrane CB04 sur la rampe de filtration. Filtrer 100 µl de l'échantillon à analyser.

Placer la membrane sur le tampon.

Incuber durant 15 minutes à 37°C.

Exemple 2. Anticorps marqué.

Aussi, une solution de marquage comprenant un anticorps marqué peut être utilisée dans le procédé de détection de l'invention selon le protocole suivant

- Prélever 90 µl d'une dilution de l'échantillon,

WO 03/025207

34

PCT/FR02/03132

- Ajouter 10 µl de l'anticorps anti-glycophorine-PE,
- Vortexer et incuber durant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière,
- 5 - Ajouter 900 µl de tampon PBS,
- Placer la membrane CB04 dans la rampe de filtration,
- Filtrer sous vide 100 µl de la solution à analyser,
- 10 - Analyser la membrane dans l'Analyseur en inversant les câbles primaire et tertiaire de l'Analyseur.

15 Exemple 3 : Intérêt de l'ajout d'un agent de perméabilisation des bactéries pour améliorer la pénétration du marqueur.

Méthode

- Les souches sont conservées dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubées à 37 °C durant 18-20 24 heures.
- Après détermination du nombre de bactéries par marquage estérasique, 3000 bactéries sont inoculées dans 3 mL de concentré plaquettaire
- Les 3mL sont traités avec 1 ml de la solution d'agrégation (CD9 :clone 6B1: 30µg/mL, Picogreen 1/2000, 25 PEI 40µg/mL à 80µg/mL) durant 40 minutes
- L'échantillon est filtré au travers d'un filtre de porosité 5 µm
- L'échantillon est incubé dans la solution de 30 lyse (Chlorhexidine 5.10⁻³ %, NOG 0,5%, Nisin 0,2 µg/mL, EDTA 5 mM) pendant 20 minutes
- La totalité de l'échantillon est filtrée sur une membrane CB04

- Le dénombrement est effectué au moyen d'un analyseur cytomètre en phase solide

5 V. CONCLUSIONS

Les options techniques pour atteindre les meilleures conditions de préparation des germes pathogènes ont été définies à l'aide de ses travaux expérimentaux.

10 En ce qui concerne les concentrés plaquettaires ces options techniques comportent :

1) Etape d'agrégation avec par exemple un anticorps activateur plaquettaire tel que CD9,

15 2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison des détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

En ce qui concerne les concentrés de globules rouges :

20 1) Etape d'agglutination avec une lectine telle que par exemple Phaseolus vulgaris,

2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison de détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

25 Le marquage et la perméabilisation des germes pathogènes pouvant intervenir indistinctement lors de l'étape d'agrégation, lors de l'étape de lyse ou directement sur les germes concentrés sur le dernier filtre avant analyse.

30

REVENDICATIONS

- 1) Procédé de concentration de germes
contaminants éventuellement présents dans un produit
5 sanguin comprenant des cellules sanguines, caractérisé en
ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) on soumet un échantillon dudit produit
sanguin à un traitement d'agrégation des cellules
10 sanguines,
- b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a)
par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre
laissant passer les germes contaminants mais pas les
agrégats de cellules,
- c) on lyse sélectivement les cellules
15 résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b),
- d) on récupère les germes contaminants par
passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre
laissant passer les débris cellulaires.
- 2) Procédé de détection de germes contaminants
20 dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines,
caractérisé en ce que l'on concentre lesdits germes sur un
filtre selon les étapes (a) à (d) du procédé selon la
revendication 1, puis en ce que :
- 25 (e) on analyse le second filtre pour détecter
les germes contaminants éventuellement retenus.
- 3) Procédé de détection selon la revendication
2, caractérisé en ce que l'on ajoute un agent de marquage
30 des germes contaminants, soit lors de l'agrégation de
l'étape (a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit
directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e)
d'analyse.

4) Procédé selon les revendications 2 ou 3, caractérisé en ce qu'il comprend l'addition d'un agent de perméabilisation des germes contaminants, à au moins l'une des étapes (a), (c), ou (e).

5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de perméabilisation est choisi parmi le groupe comprenant : le polyéthylèneimine, le diacétate de chlorhexidine, le digluconate de chlorhexidine, l'acide d'éthylène diamine tetracétate (EDTA) seul ou en combinaison avec la nisine, un détergent ou un mélange de ceux-ci.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi le groupe comprenant : N-Octyl β -D-glucopyranoside, SDS, Tween, triton, Brij, ou un mélange de ceux-ci.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que l'agent de marquage des germes pathogènes est une solution de marquage choisie parmi le groupe comprenant un substrat estérasique tel que le ChemChrome V6, un anticorps marqué ou un marqueur d'acides nucléiques.

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que l'agent de marquage comprend un marqueur fluorescent ou un agent couplé à un fluorochrome ou à un enzyme permettant la dégradation d'un substrat rendu ainsi fluorescent.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la fluorescence est détectée au moyen d'une excitation laser.

10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des plaquettes et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le groupe comprenant :

- un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,

- un agoniste fort de l'activation plaquettaire choisie parmi : la thrombine, le TRAP (thrombin receptor activating peptide), la trypsine, le collagène, le thromboxane A₂, le PAF (platelet activating factor), le ionophore A23187, les complexes immuns et facteurs du complément,

- un agoniste faible de l'activation plaquettaire choisie parmi ADP, adrénaline, acide arachidonique, facteur Von Willebrand, sérotonine ou épinéphrine.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration en anticorps de type CD9 dans la composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 50 µg/ml, et de préférence entre 5 µg/ml et 40 µg/ml.

13) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration en agoniste fort dans la composition d'agrégation est comprise entre :

- 0,5 UI/ml et 100 UI/ml et de préférence entre
1 UI/ml et 20 UI/ml pour un agoniste de type thrombine,
- 5 μ M et 200 μ M et de préférence entre 10 μ M
et 100 μ M pour un agoniste de type TRAP,
5 - 1 nM et 500 nM et de préférence entre 10 nM
et 300 nM pour un agoniste de type trypsine,
- 0,05 μ g/ml et 50 μ g/ml et de préférence entre
1 μ g/ml et 20 μ g/ml pour un agoniste de type collagène,
- 0,01 μ g/ml et 5 μ g/ml et de préférence entre
10 0,1 μ g/ml et 1 μ g/ml pour un agoniste du type thromboxane
A₂,
- 0,005 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre
0,05 mg/ml et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type PAF,
- 0,1 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M
15 et 20 μ M pour un agoniste du type ionophore A23187.

14) Procédé selon la revendication 11,
caractérisé en ce que la concentration en agoniste faible
dans la composition d'agrégation est comprise entre :
20 - 0,5 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M
et 20 μ M pour un agoniste du type ADP, du type adrénaline ou
du type épinéphrine.
- 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre
0,01 mM et 5 mM pour un agoniste du type acide
25 arachidonique,
- 0,001 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre
0,01 mg/ml et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type facteur
Von Willebrand, ou
- 0,05 μ M et 100 μ M et de préférence entre
30 0,01 μ M et 50 μ M pour un agoniste du type sérotonine.

15) Procédé selon la revendication 11,
caractérisé en ce que l'anticorps est choisi parmi: un

anticorps anti-CD9, anti-CD32, anti-PTA1, anti-D42, anti-GpIIb/IIIa ou anti-GpIV.

5 16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des globules rouges et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent
10 d'agglutination choisi parmi les lectines, le polyéthylèneimine, la polyvinylpyrrolidone (PVP), les gélatines, les dextrans ou les polyéthylène glycols (PEG).

15 17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les lectines présentent une activité érythroagglutinine.

20 18) Procédé selon les revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* ou *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgare*.

25 19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la concentration de lectine de *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 µg/ml et 800 µg/ml.

30 20) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la concentration de polyéthylèneimine dans la composition d'agglutination est comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume) de préférence entre 20% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

21) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la Polyvinylpyrrolidone (PVP) est choisie parmi le groupe comprenant du PVP-40 et du PVP-360 et utilisée de préférence à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout
5 préférentiellement entre 4% (poids/volume) et 20% (poids/volume).

22) Procédé selon la revendications 16, caractérisé en ce que la gélatine dans la composition d'agglutination est utilisée de préférence à une concentration comprise entre 0,5% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout préférentiellement entre 40% (poids/volume) et 20% (poids/volume).
10

23) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dextran dans la composition d'agglutination est choisi parmi le groupe comprenant : Dextran 70, Dextran 100, et Dextran 500, utilisé de préférence à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout
20 préférentiellement entre 4% (poids/volume) et 20% (poids/volume).

24) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le polyéthylène glycol est choisi parmi le groupe comprenant : PEG8, PEG17, PEG35, utilisé de préférence à une concentration comprise entre 0,05% (poids/volume) et 40% (poids/volume) et tout
25 préférentiellement entre 20% (poids/volume) et 40% (poids/volume).
30

25) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lyse

des cellules de l'étape (c) est réalisée avec une solution de lyse comprenant un ou plusieurs détergents choisis dans le groupe comprenant : saponine, SDS, Tween 20, Triton X100, Brij 96, Polidocanol, N-octyl β -D-glucopyranoside ou Carbonate de sodium.

26) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les germes contaminants sont des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures, des spores de bactéries vivantes et/ou mortes.

27) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 μ m et 20 μ m.

28) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μ m et 2 μ m.

29) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les germes contaminants sont des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures ou des spores de bactéries vivantes et/ou mortes, en ce que la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 μ m et 20 μ m, et en ce que la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μ m et 2 μ m.

30) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 29, caractérisé en ce que la détection des germes contaminants de l'étape (e) est réalisée dans un dispositif clos.

31) Dispositif pour la concentration de germes
contaminants éventuellement présents dans un produit
sanguin comprenant des cellules sanguines, susceptible
d'être mis en œuvre dans un procédé selon l'une quelconque
des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il
comprend :

- un premier réservoir (1) étanche et stérile
contenant au moins un agent d'agrégation de cellules
sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage
de germes pathogènes,
- un deuxième réservoir (2) étanche et stérile
contenant au moins un agent de lyse de cellules sanguines
et éventuellement au moins un agent de marquage de germes
pathogènes,
- un premier filtre (3) placé entre le premier
et le deuxième réservoir capable de retenir les agrégats
formés dans ledit premier réservoir,
- un deuxième filtre (4) placé en aval du
deuxième réservoir capable de retenir les éventuels germes
contaminants,
- des moyens de connexion (5) étanches et
stériles placés, entre le premier réservoir et le premier
filtre, entre le premier filtre et le deuxième réservoir et
entre le deuxième réservoir et le deuxième filtre.

32) Dispositif selon la revendication 31
caractérisé en ce qu'il comprend une connexion (6) étanche
et stérile pour relier la poche contenant le produit
sanguin au premier réservoir stérile.

33) Dispositif selon la revendication 32,
caractérisé en ce que ladite connexion étanche et stérile
reliant la poche contenant le produit sanguin au premier
réservoir stérile est munie d'une valve (7) anti-retour.

34) Dispositif selon les revendications 31 ou
33 caractérisé en ce qu'il comprend des moyens
d'échantillonnage d'un volume déterminé du produit sanguin
5 directement à partir d'une poche de stockage dudit produit
vers ledit premier réservoir.

35) Dispositif selon les revendications 36 ou
34, caractérisé en ce que le premier réservoir stérile est
10 muni d'un système d'aspiration de l'échantillon (8).

36) Dispositif selon la revendication 35,
caractérisé en ce que le système d'aspiration est un
piston.
15

37) Dispositif selon l'une quelconque des
revendications 31 à 36, caractérisé en ce que le deuxième
filtre est inclus dans un support de membrane composé de 2
parties pouvant être dissociées permettant de récupérer le
20 filtre.

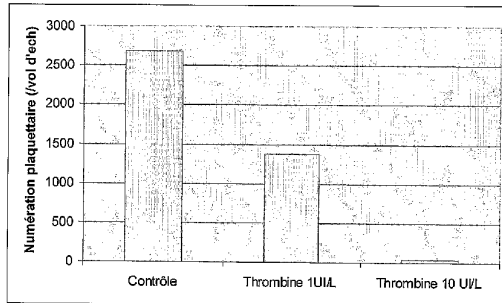
38) Dispositif selon l'une quelconque des
revendications 31 à 37, caractérisé en ce qu'il est clos et
stérile.

WO 03/025207

PCT/FR02/03132

1/12

FIGURE 1

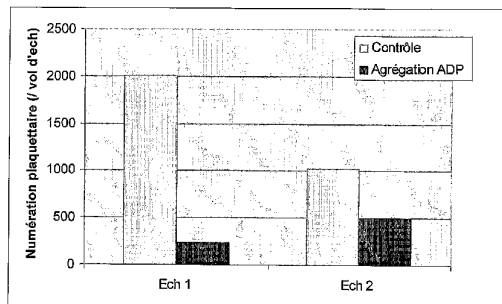


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

2/12

FIGURE 2

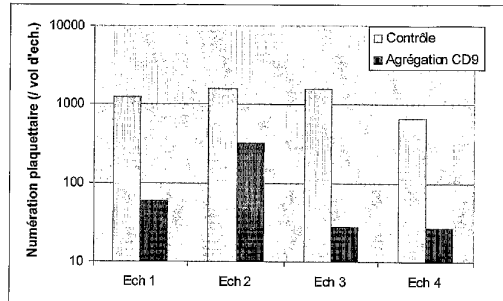


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

3/12

FIGURE 3

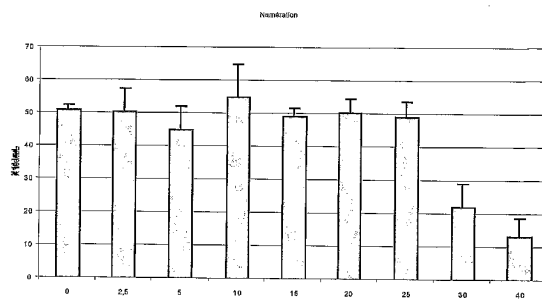


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

4/12

FIGURE 4

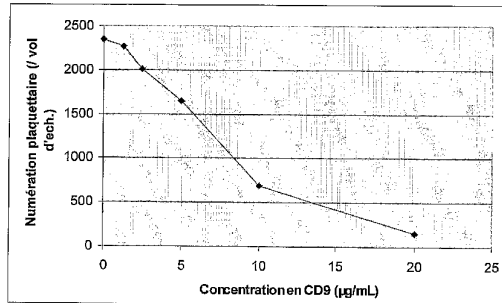


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

5/12

FIGURE 5

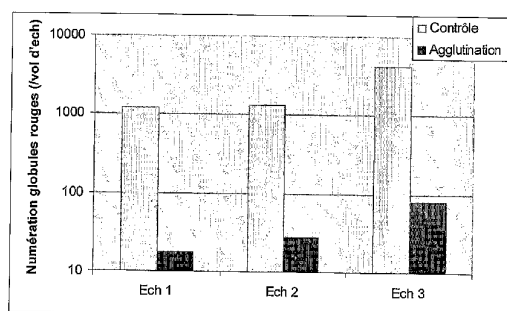


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

6/12

FIGURE 6

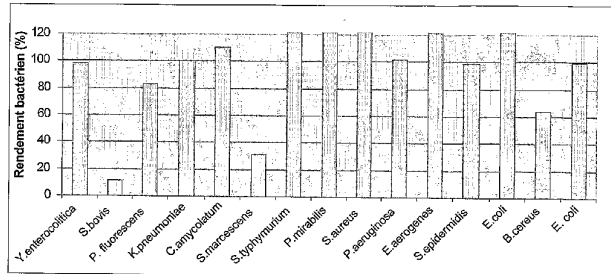


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

7/12

FIGURE 7

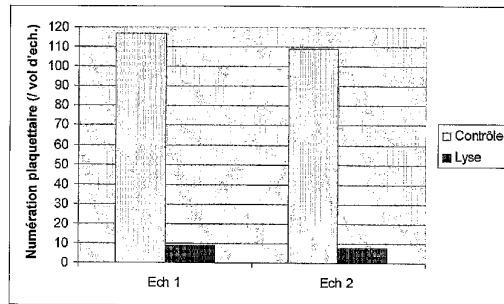


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

8/12

FIGURE 8

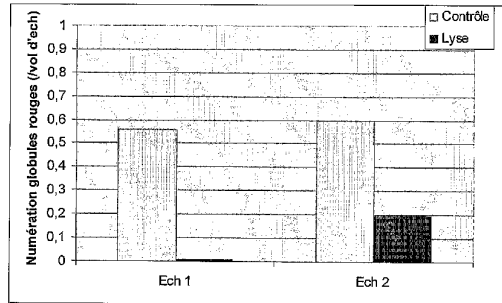


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

9/12

FIGURE 9

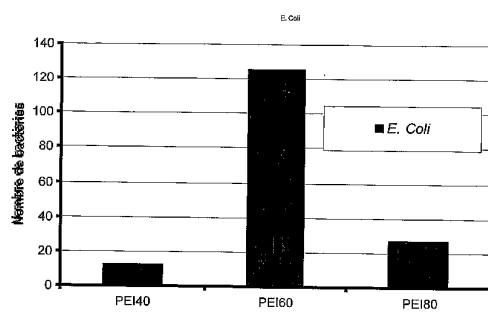


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

10/12

FIGURE 10

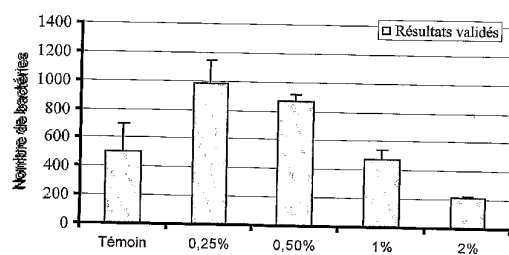


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

11/12

FIGURE 11

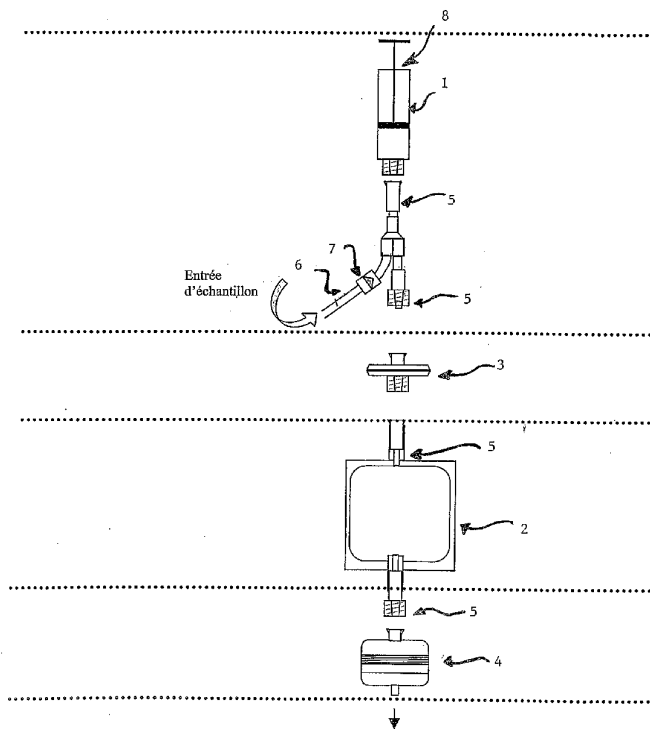


WO 03/025207

PCT/FR02/03132

12/12

FIGURE 12



【手続補正書】

【提出日】平成15年9月17日(2003.9.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の検出方法であって、次のステップ：

- a) 前記血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を受けさせる、
- b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第1フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ(a)で形成した凝集体を除去する、
- c) ステップ(b)で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、
- d) 細胞片を通す第2フィルタに、ステップ(c)の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収する、
- e) ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際に汚染菌のマーキング剤を添加する、及び
- f) 場合により留め置かれるマークした汚染菌を検出するために第2フィルタを分析することを含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

ステップ(a)、(c)又は(e)の少なくとも1つで、汚染菌の透過化処理剤の添加を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

透過化処理剤は：ポリエチレンイミン、二酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、単独の、又はナイシンと組み合わせたエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、洗剤又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

洗剤は：N-オクチルβ-D-グルコピラノシド、SDS、ツイーン、トリトン、Brj又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

病原菌のマーキング剤は、ChemChrome V6のようなエステルゼ基質、マークされた抗体又は核酸マーカを含む群から選択されるマーキング溶液であることを特徴とする請求項2から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

マーキング剤は、蛍光マーカ、又は蛍光色素、若しくは蛍光にされる基質の分解を可能にする酵素に連結される薬剤を含むことを特徴とする請求項2から5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

蛍光は、レーザー励起によって検出されることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】

血液製剤の血液細胞は、血小板若しくは赤血球、又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

血液製剤は、血小板を含むこと、及びステップ(a)の凝集処理は：

- 血小板抗原の特異性抗体、
- トロンビン、TRAP(トロンビンレセプタ活性化ペプチド)、トリプシン、コラーゲン、トロンボキサンA2、PAF(血小板活性化因子)、イオノホアA23187、免疫複合体及び補体因子から選択される強い血小板活性化作用薬、

- A D P、アドレナリン、アラキドン酸、フォン・ヴィレブラント因子、セロトニン又はエピネフリンから選択される弱い血小板活性化作用薬を含む群から選択される凝集剤の少なくとも1つを含む凝集組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

凝集組成物中のC D 9タイプの抗体の濃度は、 $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $5 \mu\text{g/ml} \sim 40 \mu\text{g/ml}$ であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

凝集組成物中の強い作用薬の濃度は：

- トロンピンタイプの作用薬に関して $0.5 \text{UI/ml} \sim 100 \text{UI/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \text{UI/ml} \sim 20 \text{UI/ml}$ であり、
- T R A Pタイプの作用薬に関して $5 \mu\text{M} \sim 200 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、
- トリプシンタイプの作用薬に関して $1 \text{nM} \sim 500 \text{nM}$ であり、かつ好ましくは、 $10 \text{nM} \sim 300 \text{nM}$ であり、
- コラーゲンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 20 \mu\text{g/ml}$ であり、
- トロンボキサンA 2タイプの作用薬に関して $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 5 \mu\text{g/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ であり、
- P A Fタイプの作用薬に関して $0.005 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.05 \text{mg/ml} \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、
- イオノホアA 2 3 1 8 7タイプの作用薬に関して $0.1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項12】

凝集組成物中の弱い作用薬の濃度は：

- A D Pタイプ、アドレナリンタイプ又はエピネフリンタイプの作用薬に関して $0.5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ であり、
- アラキドン酸タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{mM} \sim 5 \text{mM}$ であり、
- フォン・ヴィレブラント因子タイプの作用薬に関して $0.001 \text{mg/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{mg/ml} \sim 0.5 \text{mg/ml}$ であり、又は
- セロトニンタイプの作用薬に関して $0.05 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、かつ好ましくは、 $0.01 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項13】

抗体は：抗C D 9、抗C D 3 2、抗P T A 1、抗D 4 2、抗G p I I b / I I I a又は抗G p I V抗体から選択されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項14】

血液製剤は、赤血球を含むこと、及びステップ(a)の凝集処理は、レクチン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン(P V P)、ゼラチン、デキストラン又はポリエチレングリコール(P E G)から選択される少なくとも1つの凝着剤を含む凝着組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項1から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

レクチンは、エリトロアグルチニン(e r y t h r o a g g l u t i n i n e)活性を有することを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

レクチンは、インゲンマメ、カラスノエンドウ、ソラマメ又はエリスリナ・コラロデンドロンのレクチンから選択されることを特徴とする請求項14又は15に記載の方法。

【請求項17】

凝着組成物中のインゲンマメのレクチンの濃度は、 $10 \mu\text{g/ml} \sim 200 \mu\text{g/ml}$ で

あることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

凝着組成物中のポリエチレンイミンの濃度は、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、好ましくは20（重量／体積）％～40（重量／体積）％であることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

ポリビニルピロリドン（PVP）は、PVP-40 及び PVP-360 を含む群から選択され、かつ好ましくは、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは4（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

凝着組成物中のゼラチンは、好ましくは、0.5（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは4（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 21】

凝着組成物中のデキストランは：デキストラン70、デキストラン100、デキストラン500 を含む群から選択され、好ましくは、0.1（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは4（重量／体積）％～20（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

ポリエチレングリコールは：PEG8、PEG17、PEG35 を含む群から選択され、好ましくは、0.05（重量／体積）％～40（重量／体積）％、かつ非常に好ましくは20（重量／体積）％～40（重量／体積）％の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ（c）の細胞溶解は：サポニン、SDS、ツイーン20、トリトンX100、Brij96、ポリドカノール、Nβ-D-オクチルグルコピラノシド、又は炭酸ナトリウムを含む群から選択される1つ又は幾つかの洗剤を含む溶解溶液によって行われることを特徴とする請求項 1 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、生及び／又は死細菌の孢子であることを特徴とする請求項 1 から 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

第1フィルタの孔の寸法は、2μm～20μmであることを特徴とする請求項 1 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

第2フィルタの孔の寸法は、0.2μm～2μmであることを特徴とする請求項 1 から 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、又は生及び／又は死細菌の孢子であること、第1フィルタの孔の寸法は、2μm～20μmであること、及び第2フィルタの孔の寸法は、0.2μm～2μmであることを特徴とする請求項 1 から 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

ステップ（f）の汚染菌の検出は、密閉した装置中で行われることを特徴とする請求項 1 から 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1 から 28 のいずれかに記載の方法において利用され得る、血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌濃縮装置であって：

- 血液細胞の少なくとも1つの凝集剤及び場合により病原菌の少なくとも1つのマーキング

グ剤を含む、密封かつ無菌の第 1 タンク (1)、

- 血液細胞の少なくとも 1 つの溶解剤及び場合により病原菌の少なくとも 1 つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第 2 タンク (2)、

- 前記第 1 タンク中に形成された凝集体を留め置くことが可能な、第 1 及び第 2 タンクの間には置かれる第 1 フィルタ (3)、

- 汚染菌となり得るものを留め置くことが可能な、第 2 タンクの下流に置かれる第 2 フィルタ (4)、

- 第 1 タンク及び第 1 フィルタの間、第 1 フィルタ及び第 2 タンクの間、並びに第 2 タンク及び第 2 フィルタの間に置かれる密封かつ無菌の接続手段 (5) を含むことを特徴とする装置。

【請求項 30】

血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンクに連結するために、密封かつ無菌の接続 (6) を含むことを特徴とする請求項 29 に記載の装置。

【請求項 31】

血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンクに連結する、密封かつ無菌の前記接続は、逆止め弁 (7) を備えることを特徴とする請求項 30 に記載の装置。

【請求項 32】

所定の体積の血液製剤を、前記第 1 タンクに向けて前記製剤の貯蔵ポケットから直接、試料採取する手段を含むことを特徴とする請求項 29 又は 31 に記載の装置。

【請求項 33】

無菌の第 1 タンクは、試料吸入システム (8) を備えることを特徴とする請求項 30 又は 32 に記載の装置。

【請求項 34】

吸入システムは、ピストンであることを特徴とする請求項 33 に記載の装置。

【請求項 35】

第 2 フィルタは、フィルタを回収することを可能にする、分離され得る 2 つの部分から構成される膜支持体中に含まれることを特徴とする請求項 29 から 34 のいずれかに記載の装置。

【請求項 36】

密閉され、かつ無菌であることを特徴とする請求項 29 から 35 のいずれかに記載の装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/03132												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/04 C12M1/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12M G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) PAJ, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 July 1999 (1999-07-15) claims</td> <td>1-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 January 1972 (1972-01-18) page 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56</td> <td>1-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) column 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56 -/-</td> <td>4-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 July 1999 (1999-07-15) claims	1-38	Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 January 1972 (1972-01-18) page 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56	1-38	Y	WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) column 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56 -/-	4-9
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 July 1999 (1999-07-15) claims	1-38												
Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 January 1972 (1972-01-18) page 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56	1-38												
Y	WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) column 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56 -/-	4-9												
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.														
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *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. *S* document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search: 20 December 2002		Date of mailing of the international search report: 03/01/2003												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016		Authorized officer: Vadot-Van Geldre, E												

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/03132
D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89 04372 A (BERG JAMES D) 18 May 1989 (1989-05-18) abstract page 6 -page 7 ----	4-9
Y	US 5 766 552 A (DOSHI SONAL R ET AL) 16 June 1998 (1998-06-16) column 6, line 19-22; tables 1,2 column 11, line 1-10 ----	16-24
Y	US 5 302 512 A (PERNELLE MICHEL) 12 April 1994 (1994-04-12) column 4, line 26-36 ----	15-24
A	US 5 316 731 A (SCHRENK W JUERGEN ET AL) 31 May 1994 (1994-05-31) column 5, line 10-50 ----	1-38
A	US 5 981 294 A (ALLEN MICHAEL P ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) column 3, line 30-43 column 5, line 14-17 -----	1-38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No.
 PCT/FR 02/03132

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
DE 19801090	A	15-07-1999	DE	19801090 A1		15-07-1999
US 3635798	A	18-01-1972	NONE			
WO 0109370	A	08-02-2001	AU	6686000 A		19-02-2001
			WO	0109370 A2		08-02-2001
			DE	10036931 A1		23-05-2001
			EP	1198713 A2		24-04-2002
			US	2002127547 A1		12-09-2002
WO 8904372	A	18-05-1989	AT	117378 T		15-02-1995
			AT	147790 T		15-02-1997
			AU	2602488 A		01-06-1989
			DE	3852825 D1		02-03-1995
			DE	3852825 T2		18-05-1995
			DE	3855762 D1		27-02-1997
			DE	3855762 T2		07-05-1997
			EP	0386051 A1		12-09-1990
			EP	0574977 A1		22-12-1993
			WO	8904372 A1		18-05-1989
			US	5518894 A		21-05-1996
			US	5292644 A		08-03-1994
US 5766552	A	16-06-1998	US	5652148 A		29-07-1997
			AU	6708694 A		08-11-1994
			WO	9424555 A1		27-10-1994
			US	5660798 A		26-08-1997
US 5302512	A	12-04-1994	FR	2676123 A1		06-11-1992
			AT	112392 T		15-10-1994
			CA	2067584 A1		03-11-1992
			DE	69200460 D1		03-11-1994
			DE	69200460 T2		11-05-1995
			EP	0512896 A1		11-11-1992
			ES	2061324 T3		01-12-1994
			JP	3186831 B2		11-07-2001
			JP	5264543 A		12-10-1993
US 5316731	A	31-05-1994	AT	149880 T		15-03-1997
			AU	667760 B2		04-04-1996
			AU	5457794 A		08-06-1994
			CA	2146257 A1		26-05-1994
			DE	69308875 D1		17-04-1997
			DE	69308875 T2		03-07-1997
			DK	669855 T3		15-09-1997
			EP	0669855 A1		06-09-1995
			ES	2099984 T3		01-06-1997
			GR	3023338 T3		29-08-1997
			JP	3286919 B2		27-05-2002
			JP	8511957 T		17-12-1996
			WO	9411107 A1		26-05-1994
US 5981294	A	09-11-1999	AU	1126197 A		19-06-1997
			CA	2238926 A1		05-06-1997
			EP	0891544 A1		20-01-1999
			JP	2000501183 T		02-02-2000
			WO	9720207 A1		05-06-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		de Internationale No PCT/FR 02/03132
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/04 C12M1/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12Q C12M G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) PAJ, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ; HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 juillet 1999 (1999-07-15) revendications	1-38
Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 janvier 1972 (1972-01-18) page 2, ligne 8-24 colonne 3, ligne 19-23 colonne 3, ligne 48 -colonne 4 colonne 6, ligne 39-56	1-38
Y	WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ; PROFOS GMBH (DE)) 8 février 2001 (2001-02-08) colonne 2, ligne 8-24 colonne 3, ligne 19-23 colonne 3, ligne 48 -colonne 4 colonne 6, ligne 39-56	4-9
-/--		
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *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 (elle qu'indiquée) *C* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou 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 *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *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 *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 décembre 2002		03/01/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040; Tx: 51 651 epo nl; Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vadot-Van Geldre, E

Formulaire PCT/IBA/210 (classification fautive) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 de Internationale No
 PCT/FR 02/03132

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 89 04372 A (BERG JAMES D) 18 mai 1989 (1989-05-18) abrégé page 6 -page 7 ---	4-9
Y	US 5 766 552 A (DOSHI SONAL R ET AL) 16 juin 1998 (1998-06-16) colonne 6, ligne 19-22; tableaux 1,2 colonne 11, ligne 1-10 ---	16-24
Y	US 5 302 512 A (PERNELLE MICHEL) 12 avril 1994 (1994-04-12) colonne 4, ligne 26-36 ---	15-24
A	US 5 316 731 A (SCHRENK W JUERGEN ET AL) 31 mai 1994 (1994-05-31) colonne 5, ligne 10-50 ---	1-38
A	US 5 981 294 A (ALLEN MICHAEL P ET AL) 9 novembre 1999 (1999-11-09) colonne 3, ligne 30-43 colonne 5, ligne 14-17 -----	1-38

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE				C - ide internationale No	
Renseignements relatifs		membres de familles de brevets		PCT/FR 02/03132	
Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
DE 19801090	A	15-07-1999	DE 19801090 A1		15-07-1999
US 3635798	A	18-01-1972	AUCUN		
WO 0109370	A	08-02-2001	AU 6686000 A		19-02-2001
			WO 0109370 A2		08-02-2001
			DE 10036931 A1		23-05-2001
			EP 1198713 A2		24-04-2002
			US 2002127547 A1		12-09-2002
WO 8904372	A	18-05-1989	AT 117378 T		15-02-1995
			AT 147790 T		15-02-1997
			AU 2602488 A		01-06-1989
			DE 3852825 D1		02-03-1995
			DE 3852825 T2		18-05-1995
			DE 3855762 D1		27-02-1997
			DE 3855762 T2		07-05-1997
			EP 0386051 A1		12-09-1990
			EP 0574977 A1		22-12-1993
			WO 8904372 A1		18-05-1989
			US 5518894 A		21-05-1996
			US 5292644 A		08-03-1994
US 5766552	A	16-06-1998	US 5652148 A		29-07-1997
			AU 6708694 A		08-11-1994
			WO 9424555 A1		27-10-1994
			US 5660798 A		26-08-1997
US 5302512	A	12-04-1994	FR 2676123 A1		06-11-1992
			AT 112392 T		15-10-1994
			CA 2067584 A1		03-11-1992
			DE 69200460 D1		03-11-1994
			DE 69200460 T2		11-05-1995
			EP 0512896 A1		11-11-1992
			ES 2061324 T3		01-12-1994
			JP 3186831 B2		11-07-2001
			JP 5264543 A		12-10-1993
US 5316731	A	31-05-1994	AT 149880 T		15-03-1997
			AU 667760 B2		04-04-1996
			AU 5457794 A		08-06-1994
			CA 2146257 A1		26-05-1994
			DE 69308875 D1		17-04-1997
			DE 69308875 T2		03-07-1997
			DK 669855 T3		15-09-1997
			EP 0669855 A1		06-09-1995
			ES 2099984 T3		01-06-1997
			GR 3023338 T3		29-08-1997
			JP 3286919 B2		27-05-2002
			JP 8511957 T		17-12-1996
			WO 9411107 A1		26-05-1994
US 5981294	A	09-11-1999	AU 1126197 A		19-06-1997
			CA 2238926 A1		05-06-1997
			EP 0891544 A1		20-01-1999
			JP 2000501183 T		02-02-2000
			WO 9720207 A1		05-06-1997

Formulaires PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 1/28 C 1 2 M 1/34 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジャン - ピエール エルメ
フランス国、ブローニュ エフ - 9 2 1 0 0、アヴニユ チャールス ドゥ ゴール、4テール

(72)発明者 イサベル ベッソン - フォール
フランス国、オーバニユ エフ - 1 3 4 0 0、プロムナード ピエール ブランカルド、ヴィラ
レ トローネ

(72)発明者 セバスチャン リポルト
フランス国、プラン ドゥ キュクエス エフ - 1 3 3 8 0、アヴニユ デュ ジェネラル ドゥ
ゴール、レジデンス シャンテコート

(72)発明者 ヤン ゴフリン
フランス国、リヨン エフ - 6 9 0 0 9、リュ エミル デュボー、5

(72)発明者 アン モノト デ アングル
フランス国、サン レミー エフ - 7 1 1 0 0、ケ ベルヴュ、6

F ターム(参考) 2G045 AA28 BA13 BB04 BB29 BB38 CA25 CB21 FA11 FB12 GC15
HA06 HA14
2G052 AA30 AB16 AD26 AD52 EA03 EB12 ED01 ED16 FD01 FD20
GA11 GA30
4B029 AA07 AA09 BB02 BB06 BB11 BB16 BB17 CC01 DG08 FA05
FA09 HA06
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ06 QQ07 QQ32 QQ41 QR54 QR57 QR66
QR90 QS12 QS33 QS36 QS39 QX01
4B065 AA01X AA57X BD14 BD18 BD50 CA44 CA46

专利名称(译)	用于浓缩和检测来自血液制品和/或其衍生物的病原菌的装置和方法		
公开(公告)号	JP2005503803A	公开(公告)日	2005-02-10
申请号	JP2003529979	申请日	2002-09-13
申请(专利权)人(译)	嗜血系统		
[标]发明人	ジャンピエールエルメ イサベルベッソンフォール セバスチャンリポールト ヤンゴフリン アンモントデアングル		
发明人	ジャン-ピエール エルメ イサベル ベッソン-フォール セバスチャン リポールト ヤン ゴフリン アン モノト デ アングル		
IPC分类号	G01N33/48 C12M1/12 C12M1/34 C12N1/02 C12Q C12Q1/04 C12Q1/22 C12Q1/24 C12Q1/70 G01N1/28 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/86		
CPC分类号	G01N1/4077 G01N33/569 G01N33/86		
FI分类号	C12N1/02 C12M1/12 C12Q1/04 G01N33/48.B G01N1/28.J C12M1/34.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/BA13 2G045/BB04 2G045/BB29 2G045/BB38 2G045/CA25 2G045/CB21 2G045/FA11 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/HA06 2G045/HA14 2G052/AA30 2G052/AB16 2G052/AD26 2G052/AD52 2G052/EA03 2G052/EB12 2G052/ED01 2G052/ED16 2G052/FD01 2G052/FD20 2G052/GA11 2G052/GA30 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029/BB02 4B029/BB06 4B029/BB11 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/DG08 4B029/FA05 4B029/FA09 4B029/HA06 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ07 4B063/QQ32 4B063/QQ41 4B063/QR54 4B063/QR57 4B063/QR66 4B063/QR90 4B063/QS12 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/BD14 4B065/BD18 4B065/BD50 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	大西省吾 山口 修之		
优先权	2001011873 2001-09-13 FR		
其他公开文献	JP4351048B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

浓缩 (M) 可能存在于含有血细胞 (BC) 的产品中的污染细菌 (A) , 包括 : (a) 聚集BC; (b) 在允许 (A) 通过的第一过滤器上移除聚集体; (c) 滤液中残留细胞的选择性裂解; (d) 在允许细胞碎片通过的第二个过滤器上从裂解物中除去 (A) 是新的。还包括用于执行M.的设备的独立权利要求。

