

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 543 300

②1 N° d'enregistrement national :

84 03514

⑤1 Int Cl³ : G 01 N 33/54.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 7 mars 1984.

③0 Priorité : AR, 23 mars 1983, n° 292.484; 20 janvier 1984, n° 295.500.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 39 du 28 septembre 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : YANOVSKY Jorge Fernando. — AR.

⑦2 Inventeur(s) : Jorge Fernando Yanovsky.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cuer.

⑤4 Réactif sérologique.

⑤7 Ce réactif, destiné à déterminer les antigènes et les anticorps avec une sensibilité et une spécificité plus élevées que dans les techniques antérieures connues, est basé sur l'action interdépendante de deux composés actifs mis en œuvre en une seule unité de diagnostic et qui permettent d'une part d'inhiber les facteurs « du type lectine » ou « d'anticorps spécifiques » et de détecter les antigènes ou anticorps spécifiques.

Pour obtenir un tel résultat, on ajoute aux antigènes ou anticorps de cellules animales ou végétales une solution diluée d'une ou plusieurs substances des types : sucres, sucres aminés, glycérophosphates sphingomyélines, esters de choline, sels de choline ou autres dérivés d'ammonium quaternaire.

FR 2 543 300 - A1

D

La présente invention concerne un nouveau réactif sérologique pour la détermination des antigènes et anticorps.

Problème posé et état de la technique antérieure :

Le diagnostic d'un grand nombre de maladies contagieuses est
5 basé sur l'évaluation de la réponse immunologique générée par les hôtes
parasites à l'égard des agents infectieux envahisseurs.

Les méthodologies pour ce type d'études ne manquent pas mais
elles sont presque toutes basées sur le même principe qui consiste à
quantifier ou semi-quantifier les anticorps produits contre les micro-
10 organismes qui provoquent la maladie. Ce type d'investigation appartient
à la spécialité connue sous le nom de sérologie et il s'agit d'une voie
indirecte permettant de déduire l'existence d'une maladie. En fait, on
admet que si une personne possède des anticorps contre un certain agent
infectieux, cela est dû au fait que cet agent ou des composants de
15 celui-ci (antigènes) provoque une stimulation immunologique de l'hôte
et que, de ce fait, la génération des anticorps permet de formuler
l'hypothèse de la présence de l'agent infectieux.

Bien évidemment, l'efficacité du système dépendra de la fia-
bilité susceptible d'être attribuée, pour chaque détection d'anticorps,
20 à sa correspondance véritable avec un antigène ou microorganisme déter-
miné. Cette efficacité sera ainsi fonction des niveaux de détection
qui peuvent être atteints pour les anticorps.

Ces deux aspects sont généralement connus comme représentant
la spécificité et la sensibilité des tests sérologiques. De ces deux
25 notions, la sensibilité est la plus facile à obtenir pour ce qui est des
instruments, du fait de l'évolution et des améliorations des méthodes de
mesure des molécules biologiques, notamment par radioisotopes, enzymes...
etc qui permettent de détecter des quantités infinitésimales de toute
protéine immunologiquement intéressante.

La spécificité pose un problème plus difficile et implique
30 des questions relatives au stimulus des antigènes et à l'origine des
réponses qui peuvent être naturelles ou déclenchées par l'hôte stimulé.

On trouve un grand nombre d'antigènes distribués dans la
nature et repris par les créatures vivantes. Il est tout à fait classi-
35 que, dans ces conditions, que la réponse à l'un d'eux soit capable de
constituer une réaction simultanée à plusieurs porteurs de cet antigène.

Au cours des trente ou quarante années passées, les scientifiques ont entrepris beaucoup de recherches dans le domaine de l'immunochimie et se sont attachés tout spécialement à la recherche d'antigènes ayant une unique identité, pour la préparation de réactifs sérologiques. Dans quelques cas, ces efforts ont rencontré quelques succès. Toutefois ils ne sont pas faciles à accomplir et se traduisent très souvent par une réduction substantielle de la sensibilité inhérente au système.

On sait que la recherche de composants spécifiques d'un agent microbien doit être accompagnée d'une sélection dans laquelle quelques composants sont écartés et d'autres favorisés. Les hôtes parasites ne réagissent pas toujours avec la même efficacité ou sélectivité à l'égard de tous les antigènes comprenant un agent infectieux et, de ce fait, la sélection de quelques-uns d'entre eux au détriment d'autres rend l'analyse plus spécifique mais au prix d'une sensibilité réduite, attendu que, indépendamment de la sophistication des instruments, il n'est pas possible de détecter des éléments non existants dans notre composition.

Au cours de la recherche sérologique de quelques maladies, des tentatives ont été faites pour résoudre des problèmes de ce type par "neutralisation" ou "absorption" des réponses immunologiques similaires mais non spécifiques à l'agent infectieux en cause. Ces neutralisations ou absorptions ont été entreprises sur des microorganismes similaires mais non identiques à ceux recherchés. Des progrès ont ainsi été notés dans le diagnostic sérologique de la Syphilis au moyen de l'immuno-fluorescence indirecte et, dans le cas de la maladie de Chagas, pour la réactivité croisée avec les Leishmanioses. Toutefois, cette méthode n'a pas été étendue à d'autres pathologies, que ce soit du au manque de succès dans les résultats ou à une chute marquée dans les titres sérologiques et également des réponses spécifiques, après les absorptions.

Selon une alternative différente pour améliorer la spécificité, on a travaillé sur les mécanismes de la réponse naturelle ou provoquée des hôtes. On a découvert il y a plusieurs années que les immunoglobulines de type IgM présentent un comportement moins spécifique que celles de type IgG. Les immoglobulines M sont des protéines de haut

poids moléculaire agissant des ancêtres immunologiques : elles sont les premières à apparaître dans un fœtus et dans une infection ; en outre, elles incluent la meilleure part des "anticorps naturels". Elles sont actives sous forme de polymère et, si elles sont détruites, l'IgM perd pratiquement toutes ses fonctions. Les molécules IgG sont des protéines de faible poids moléculaire et représentent la réponse la plus parfaite et la plus lente à l'hôte parasite. Elles sont actives à l'état de monomère, ce qui permet une différenciation aisée de l'IgM. En utilisant une méthode de réduction modérée qui rompt les ponts disulfure en laissant intact l'état de polymère de l'IgM, cette molécule peut être désactivée sans affecter l'IgG. Un tel mécanisme a provoqué d'importantes améliorations dans la spécificité de différents tests sérologiques, notamment en ce qui concerne les essais d'agglutination de cellules ou de micro-organismes. Tel est le cas de l'agglutination directe de Chagas et de la toxoplasmose où le Demandeur et, plus tard, d'autres auteurs, ont pu prouver que l'emploi systématique de mercapto-2 éthanol (un agent réducteur doux) permet de différencier, avec une efficacité acceptable, des personnes présumées normales et d'autres personnes qui ont été infectées.

Description de l'invention

Par une exploration en profondeur de cette ligne de recherches, il a maintenant été trouvé qu'il existe, dans les sérums de personnes en bonne santé, un nombre important de réactifs non spécifiques qui résistent à l'action du mercapto-2 éthanol. Cela signifie que de tels sérums continuent à avoir une capacité d'agglutination non spécifique après mise en contact avec le mercapto-2 éthanol. En fait, il n'a pas été possible d'associer cette activité à des molécules de type immunoglobulinique et l'on a donc commencé à mettre de côté la fonction anticorps de ces dernières. Il s'agit là d'une très importante découverte en sérologie car, dans le passé, on admettait que la réactivité des sérums, à l'égard de différents types d'antigènes, était basée rigoureusement sur les principes immunologiques de la réaction antigène-anticorps. La preuve directe ou indirecte d'autres facteurs fournit la possibilité d'améliorer les mécanismes de spécificité en éliminant cette activité indésirable. La présence de réactifs non spécifiques, même à des taux faibles (c'est-à-dire pour des concentrations élevées en sérum ou à de faibles dilutions sérologiques, par exemple : 1/2 ; 1/4 ou 1/8), est

une source de sérieux problèmes en ce qui concerne la différenciation sérologique, notamment quand les taux (ou titres) spécifiques sont faibles ou lorsque le but est d'augmenter la sensibilité de tout le système. Dans de tels cas, la détection de ce qu'on appelle les "bruits de fond", provoqués par la présence de réactifs non spécifiques, est également augmentée. Afin d'améliorer la qualité de toute technique sérologique, il est indispensable de faire une discrimination, autant que possible, entre les résultats correspondant à la population stimulée et ceux correspondant à la population non stimulée. A cet égard, l'élimination des réactifs non spécifiques d'une variété quelconque représente une réelle avance en sérologie.

Afin d'être sûr que les réactifs non spécifiques susmentionnés possédaient, entre autres choses, une forte capacité d'aggrégation ou d'agglutination à l'égard de cellules animales ou végétales ou ^{des fractions} core/de ces cellules, le Demandeur a assimilé au départ ce comportement à celui de lectines et a poursuivi ses travaux en se référant à des substances analogues à la lectine.

On sait que l'on peut extraire des fruits des plantes légumineuses, ou d'autres graines, des substances connues sous le nom de lectines qui ont la capacité de se combiner spontanément avec des carbohydrates de structure plus complexe, présents dans des microorganismes et dans des cellules animales ou végétales, partout dans la nature. Du fait qu'actuellement la signification précise de ces substances n'a pas été clarifiée, il est probable que -parmi d'autres fonctions- elles agissent comme colles ou ciments entre les cellules mais leur isolement et leur emploi en biologie sont maintenant de plus en plus fréquents pour la sélection de différents microorganismes, de cellules ou d'antigènes.

En fait, la plupart des cellules possèdent dans leurs membranes interne et externe une composition riche en glucides sous la forme de polysaccharides, glycoprotéines, glycérphosphatides ou phospholipides complexes. Lorsque des cellules microbiennes, ou des fractions de celles-ci, ou encore des cellules animales telles que des globules rouges sanguins, porteurs d'antigènes fixés à leur surface, sont utilisées comme matériau antigène, par exemple lors d'une agglutination, la présence de facteurs d'agglutination non spécifiques qui

réagissent avec des sucres ou des phospholipides est clairement établie. L'hypothèse de la présence de substances de type lectine dans les humains n'est pas rapportée. En réalité, on a fourni, il y a quelque temps, la preuve qu'une glycoprotéine dénommée "laminine" et agissant apparemment comme colle cellulaire dans les membranes fondamentales de l'endothélium, possède une puissante action non spécifique sur les globules rouges sanguins des béliers fixés par des aldéhydes. Il faut souligner que ce type de globule rouge constitue un support universellement connu pour les antigènes d'hémagglutination et que l'on peut détecter pratiquement à coup sûr de la laminine dans la circulation, hors le fait que cette dernière se trouve présente en grandes proportions dans les tissus.

La réactivité avec des membranes par l'intermédiaire de composants glycérophosphatidiques est bien connue pour un facteur réactif différent non immunologique tel que la protéine C réactive. L'étude de la capacité d'accouplement de cette protéine avec des substances contenant de la choline distale a abouti à la conclusion que cette capacité peut être inhibée par ce type particulier de molécule, en particulier la phosphatidyl-choline. La nouveauté essentielle de la découverte à la base de la présente invention réside dans la constatation que les réactivités sérologiques non spécifiques capables de donner des résultats faux ou réactifs notamment dans les tests d'agglutination de cellules ou des fonctions de celles-ci, peuvent être éliminées dans une large mesure en introduisant dans les réactions des substances qui, par inhibition, compétition, absorption, neutralisation ou blocage, empêchent l'effet d'aggrégation des réactifs non spécifiques du type "genre lectine" ou protéine C réactive. Parmi ces substances on doit signaler des sucres, notamment des sucres aminés, des glycérophosphatides ou phospholipides, des esters de choline, des sels de choline et des sphingomyélines. Elles agissent sur les mécanismes de couplage non spécifique avec les composants des membranes, au cours du processus de vérification sérologique des anticorps spécifiques face aux antigènes qui forment une partie des cellules ou qui sont fixés sur ces dernières.

Les facteurs non spécifiques auxquels on se réfère ici sont en général non résistants au mercapto-2 éthanol, à l'exception de la protéine C réactive, mais aussi thermiquement résistants à la température d'inactivation des fractions agglutinantes complémentaires, soit à 56°C

pendant 30 minutes. Il est ainsi possible de constater que l'effet de suppression du pouvoir agglutinant non spécifique continue, à l'évidence, après exposition des sérums au test de chauffage susvisé.

En pratique, la présence de facteurs non spécifiques du type
5 ci-dessus est mise en évidence et neutralisée par la méthodologie dite d'inhibition. Cette dernière consiste à utiliser des réactifs formés par deux composants à action indépendante qui, l'un après l'autre ou simultanément, sont mis en contact avec le sérum ou l'humeur à étudier.

Dans un tel procédé, par suite des phénomènes de séquence,
10 diffusion ou taux de combinaison, le premier composant à venir en contact avec le sérum est le sucre ou le mélange de sucres et d'autres substances simples qui, bien que n'ayant pas d'activité antigénique, jouent le rôle d'agents neutralisants pour les substances de type lectine et/ou les agglutinants non spécifiques. Le sérum neutralisé réagit
15 avec l'antigène en cause, que celui-ci forme une partie des cellules, des fonctions de cellules ou qu'il soit fixé sur ces dernières. La neutralisation des substances de type lectine et/ou des agglutinants non spécifiques est assurée par la quantification de "l'inhibition" c'est-à-dire la quantité de titres obtenus avec des sérums de personnes nor-
20 males lorsque le neutraliseur est présent dans la réaction. Simultanément, cet effet ne doit pas être constaté ou doit être minimal dans le sérum de personnes contenant des anticorps spécifiques opposés à l'antigène en cause, en particulier si le sérum est désactivé à 56° C pendant 30 minutes.

25 On a introduit, il y a quelques années, un mode différent de recherche sérologique pour la détection des antigènes de circulation. Selon cette méthode, pour détecter une infection, on recherche la présence, dans l'hôte, de fractions ou composants du microorganisme. Lorsque cela est confirmé, les probabilités d'obtention d'un diagnostic spécifique correct sont bien meilleures que lorsqu'un anticorps se trouve pré-
30 sent. La détection des antigènes est également entreprise dans des sérums ou des humeurs. L'instrument de diagnostic est constitué, dans ce cas, contrairement à celui décrit au début de la présente description, par un anticorps spécifique. Malgré cela, les substances du genre lectine
35 continuent à interférer avec le diagnostic du fait de leur aptitude à réagir avec l'anticorps spécifique ou avec son support, comme dans le cas de toute autre molécule de type antigène. Il ne faut pas oublier que

les anticorps contiennent aussi des sucres et que, couramment, les supports cellulaires préférés pour les anticorps sont des bactéries telles que le staphylocoque, riche en protéine A ou les globules rouges sanguins fixés par des aldéhydes.

Description des réactifs et exemples de réalisation

On décrira maintenant ci-dessous en détail différents réactifs utilisables, à titre non limitatif, selon l'invention.

Exemple 1

Cet exemple a trait à la suppression des réactivités non spécifiques dans la détection des anticorps pour le Trypanosoma Cruzi dans des sérums de personnes normales, ceci en utilisant un additif antigène pour la phosphorylcholine et la solution de galactose.

- Préparation du réactif :

On a collecté 3 g d'épimastigots provenant d'une culture de croissance de quatre jours de T.Cruzi. Les parasites ont été lavés plusieurs fois par une solution saline tamponnée à pH 7,8. Après cinq lavages, on a mis en suspension les protozoaires au taux de 1 pour mille dans de l'eau distillée puis abandonné cette suspension pendant une heure. Après avoir ainsi produit une lyse cellulaire, on a centrifugé la préparation à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes puis on a rendu isotonique la fraction surnageante par une solution saline tamponnée, concentrée cinq fois, à pH 6,4. On obtient ainsi la solution antigène qui sera finalement fixée aux corpuscules (ou globules) formolés.

- Globules fixés :

On a lavé plusieurs fois, avec une solution saline tamponnée à pH 7,8, une suspension de globules rouges sanguins de bœuf jusqu'à ce que toutes les traces d'hémolyse aient disparues. On a ensuite remis en suspension, dans la même solution à 10 %, la masse de globules rouges en la mélangeant avec un volume égal de solution saline à 10 % de formol. On a laissé incuber le mélange pendant une heure à 37° C.

Les cellules fixées par cette méthode ont été lavées puis remises en suspension dans la solution saline tamponnée, à pH 7,8, avec 20 % de formol.

Après nouvelle incubation durant une heure à 37° C, les cellules ont été lavées plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les traces de formol aient été éliminées. Dans de telles conditions, les globules ont été incubés à concentration de 10 % avec une concentration convenable d'acide tannique d'environ 1/10000 (variable selon chaque lot de globu-

les) puis on a laissé le mélange à 37° C pendant trente minutes. Après ce traitement, on a lavé trois fois les globules rouges sanguins avec un tampon de phosphates à pH 7,8. Finalement, les cellules ainsi remises en suspension dans un tampon phosphate à pH 6,4, ont été mélangées avec un volume égal d'antigène, préparé comme expliqué ci-dessus. Le mélange a été maintenu en incubation durant une heure. L'antigène non encore fixé a été lavé trois fois avec une solution tamponnée à 7,8. On a ainsi obtenu la suspension cellulaire sensibilisée qui sera utilisée ultérieurement dans les tests après un processus de polymérisation avec de l'aldéhyde glutarique à 2 % pendant une demi-heure.

On a ajouté à ce réactif une préparation contenant 2 % de galactose et 3 % de phosphorylcholine. Selon une variante, on peut mettre en oeuvre les mêmes inhibiteurs dans des solutions diluées de sérum, sans modifier sensiblement les résultats.

On va maintenant décrire les résultats obtenus dans des sérums de personnes en bonne santé et de personnes comportant l'infection. On a éliminé les réactivités non spécifiques dans la détection des anticorps par le T.Cruzi dans des sérums de personnes normales. On a utilisé un antigène d'hémagglutination auquel on a ajouté du galactose et de la phosphorylcholine.

Comme on peut le voir dans le tableau 1 annexé, les sérums négatifs présentent des réactivités à différentes intensités en relation avec les antigènes d'hémagglutination. En fait, de telles réactivités, mises en évidence comme un pouvoir d'agglutination non spécifique, n'existent pas dans les sérums de personnes sans Chagas ; leur présence est une indication d'anticorps non spécifiques de substances du genre lectine. Lorsqu'on reproduit les essais avec des sérums neutralisés par du galactose et de la phosphoryl-choline, cette réactivité non spécifique disparaît en grande partie. Quand on entreprend le même type d'étude sur des personnes réellement infectées, les taux d'agglutination ne sont pas modifiés, précisément parce qu'ils constituent le produit de l'action de véritables anticorps.

Exemple 2

On a utilisé une méthode d'approche similaire pour la détection des anticorps dans l'hépatite B.

- Préparation du réactif :

On a préparé une suspension de globules rouges selon la

même méthode qu'à l'exemple 1 puis on a fait adhérer les anticorps purifiés à la surface antigène de l'hépatite B (HBs).

Les anticorps purs ont été obtenus par chromatographie d'affinité. A cet effet, on a préparé une colonne de cefarose activée dans laquelle la protéine correspondant à l'antigène HBs était fixée en covalence.

On a fait couler dans la colonne un sérum de cheval hyperimmunisé par le même virus. Puis on a lavé plusieurs fois la colonne avec des phosphates tamponnés à pH 7,8 pour éliminer toute trace de protéines n'ayant pas été fixées. Ensuite, on a fait couler dans la colonne une solution tampon à pH 3 d'acide chlorhydrique et de glycine. On a pu ainsi briser la liaison antigène-anticorps et recueillir de l'anticorps pur, rapidement stabilisé à pH alcalin.

On a préparé un mélange ayant une concentration de 2mg/ml d'anticorps et de globules rouges, préalablement traité par de la glutaraldéhyde à 2,5 %, puis on a laissé incubé au réfrigérateur (à 4°C) pendant 24 heures. L'excès non fixé a été lavé plusieurs fois, le reliquat étant constitué par la suspension de cellules qui sera utilisée comme réactif en l'additionnant à des substances de type lectine jouant le rôle d'inhibiteurs. Dans ce cas, les inhibiteurs étaient constitués par de la lécithine à 1 % et de la glycosamine à 4 % et, comme précédemment on peut les trouver par substitution dans la solution de dilution de l'échantillon.

Les tests ont été effectués avec ces réactifs et les résultats sont résumés dans le tableau II ci-après. Comme on peut le constater, les sérums des personnes en bonne santé avaient des taux d'activité agglutinante non spécifique de valeur similaire à quelques-unes des réactivités spécifiques inhérentes aux supports. L'utilisation de réactifs pour neutraliser les substances de type lectine clarifie la situation en inhibant la réactivité des personnes en bonne santé sans affecter pour autant celle des supports.

Exemple 3

De façon analogue, l'invention est mise en oeuvre pour l'élimination des réactivités non spécifiques chez les personnes en bonne santé et dans des charges ou supports de Toxoplasma, ceci en utilisant la réaction d'agglutination des anticorps à l'égard des fractions desdits parasites.

- Préparation de l'antigène d'agglutination rapide pour toxoplasmose :

Des trophozoites de *Toxoplasma gondii* ont été extraits du péritoine de souris trois jours après inoculation dans une tumeur de type ascite Ehrlich. On a laissé se fixer les parasites puis on a lavé
15 plusieurs fois avec un tampon phosphate à pH 7,8 pour obtenir finalement une masse humide qui a été remise en suspension dans de l'eau distillée au taux de 2 g par 100 ml d'eau ajoutée. Ce mélange a été conservé en réfrigérateur pendant 48 heures puis on a centrifugé à 3000 tours/minu-
10 tes. On a ensuite éliminé les dépôts et l'on a mélangé la fraction sur-nageante avec 2 % de microsphères de nitrate de cellulose ayant un diamètre d'environ 20 microns. On a laissé incuber toute la masse durant 12 heures à 4°C puis lavé plusieurs fois à l'eau avec un tampon phos-
phate à pH 7,8. La suspension de particules sensibilisées, telle qu'obte-
nue, était précisément l'antigène d'agglutination rapide de toxoplasma.
15 Elle a été utilisée dans des tests d'agglutination par sédimentation et l'on a pu lire les résultats en dix minutes. Pour l'usage, l'antigène a été complété par addition de 1 % de N-acétyl-galactosamine et 1 % d'al-phosphatidyl-choline ; en variante, on peut trouver les mêmes inhi-
biteurs dans la solution de dilution échantillon.

20 Les résultats des taux ou titres sérologiques obtenus à partir des personnes en bonne santé ainsi que des supports de toxoplas-mose, avec ou sans l'aide d'inhibiteurs, sont résumés dans le tableau III annexé à la présente description.

On peut voir dans ce cas, comme pour les exemples précédents,
25 que l'effet des substances jouant le rôle de simples inhibiteurs est bien mis en évidence du fait de l'élimination des réactivités non spéci-fiques indésirables.

Exemple 4.

La présente invention a été décrite dans le but d'obtenir des
30 réactifs sérologiques ayant une spécificité et sensibilité élevées, ba-sées sur les phénomènes de neutralisation, absorption, blocage ou inhi-bition de facteurs d'agglutination non spécifiques avec des substances simples non antigéniques. Selon un facteur caractéristique, quelques-unes de ces substances simples sont capables de réagir plus facilement
35 avec les facteurs d'agglutination non spécifique que les antigènes ou anticorps eux-mêmes, du fait de leur affinité ou d'une vitesse de dif-

fusion plus élevée.

On notera que la liste des substances énumérées dans les exemples ci-dessus n'est pas limitative et peut être étendue à d'autres facteurs agglutinants non spécifiques et à des éléments simples capables de les débloquent.

Toutefois, indépendamment des considérations qui précèdent, quelques structures moléculaires, du fait de leur similarité de configuration avec les substances susmentionnées, possèdent, par simple déduction, la possibilité théorique d'une activité inhibitrice identique à celle de ces substances. En fait, tel est le cas des sels de choline et d'autres sels d'ammonium quaternaire, dans lesquels la substitution d'un radical n'affecte pas nécessairement la fonction des facteurs d'agglutination non spécifique du type protéine C réactive, ou tout autre agglutinant similaire capable d'interaction avec des molécules de choline.

Avec les produits susvisés on a entrepris des essais similaires à ceux des exemples précédents en utilisant des sels d'ammonium tels que par exemple : le bromure de diéthylméthylpropylammonium, le chlorure de glycidyltriméthylammonium, le chlorure d'hexadécyltriméthylammonium et quelques-uns des détergents cationiques basés sur des sels d'ammonium quaternaire.

On a utilisé un antigène d'hémagglutination pour Chagas, formé par une suspension de globules rouges sanguins de béliers fixés par des aldéhydes et sensibilisés par des extraits de d'épimastigots de T.Cruzi auxquels on avait ajouté 1 % glucosamine et 3 % de chlorure de glycidyltriméthylammonium.

On a testé des sérums normaux avec ou sans inhibiteurs et l'on a entrepris la même étude avec des sérums chroniques.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau IV annexé. Comme cela ressort de ce tableau, par mise en oeuvre de substances simples telles que ci-dessus, on obtient également un effet inhibiteur sur les facteurs agglutinants non spécifiques présents dans les sérums normaux, sans toutefois affecter les facteurs provoqués par l'agglutination spécifique dans les sérums des patients qui souffrent d'une infection chronique. Ces essais indiquent que l'effet d'inhibition des sels de choline est supérieur à celui des autres sels d'ammo-

nium quaternaire qui ont été testés. Ceci est probablement dû au fait que ces derniers ne peuvent pas être utilisés à des concentrations similaires à celles des sels de choline car ils se montrent plus aptes que la choline à provoquer le phénomène d'auto-agglutination des globules

5 rouges sanguins.

TABLEAUX DES RESULTATS D'ESSAIS

Légende : A signifie sérums de personnes en bonne santé

B signifie sérums porteurs de l'infection

S.In signifie sans inhibiteur

A.In signifie avec inhibiteur

51

TABLEAU I

Nbre Sérums			TITRES									
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	
10	A	269	S.In	24	42	50	48	39	26	19	15	12
			A.In	183	82	4						
	B	58	S.In				3	14	8	23	7	3
			A.In				3	14	10	22	6	3

TABLEAU II

		Nbre Sérums	TITRES									
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	
15	A	182	A.In	138	41	3						
			S.In	16	20	45	48	39	14			
	B	47	A.In						16	18	13	
			S.In						16	18	13	

20

TABLEAU III

		Nbre Sérums	TITRES											
			2	4	8	16	32	64	120	256	512	1024	2048	4096
25	A	214	S.In	17	30	32	28	53	26	12	8	2		
			A.In	82	68	53	10	1						
	B	114	S.In					8	27	28	37	6	4	4
			A.In					8	28	32	32	6	4	4

TABLEAU IV

		Sérums	TITRES									
			2	4	8	16	32	64	128	256	512	
30	Normal	S.In	24	42	50	48	39	26	19	15	12	
		A.In	80	64	60	42	21	2				
	Chronique	S.In				3	14	8	23	7	3	
		A.In				3	14	10	22	6	3	

R E V E N D I C A T I O N S

1. Réactif sérologique pour détermination des antigènes et anticorps avec une sensibilité et une spécificité accrues, caractérisé en ce qu'il est basé par l'action interdépendante, en une seule unité
5 de diagnostic, de deux composants qui, agissant simultanément ou l'un après l'autre, provoquent l'effet combiné d'inhibition de facteurs "type lectine" ou "d'anticorps non spécifiques" et de détection d'anticorps ou antigènes spécifiques ; le premier effet étant obtenu grâce
10 à un premier composant constitué de substances simples sans activité antigénique alors que le second effet est acquis grâce à un deuxième composant formé de l'antigène ou anticorps spécifique qui est recherché.

2. Réactif sérologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que les substances dudit premier composant, utilisées sous forme de solutions diluées, sont choisies dans le groupe constitué par : des
15 hydrates de carbone, des sucres, des sucres aminés, des lipides, des glycérophosphates, des esters et éthers de choline, des sphingomyélines, des sels de choline et autres dérivés d'ammoniums quaternaire ; et en ce que les antigènes ou anticorps forment une partie de cellules ou fractions de cellules animales ou végétales ou sont fixés sur ces
20 dernières.