RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 514 511**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 82 16973**

(54) **Dispositif et procédé pour déterminer la présence d'antigènes.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 33/54.

(22) Date de dépôt..... 11 octobre 1982.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *US, 13 octobre 1981, n° 310801.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 15 du 15-4-1983.

(71) Déposant : LIOTTA Lance A. — US.

(72) Invention de : Lance A. Liotta.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Société de protection des inventions,
25, rue de Ponthieu, 75008 Paris.

La présente invention concerne un dispositif et un procédé pour déterminer la présence d'antigènes dans des fluides biologiques.

Les essais de diagnostic immunologiques sont largement utilisés pour la détection d'antigènes, d'hormones, d'agents infectieux et d'anticorps sériques dans les fluides du corps. Les dosages immunologiques se répartissent généralement en deux catégories. La première comprend les essais de précipitation anticorps-antigène tels que l'immunodiffusion radiale, l'hémaglutination et l'agglutination avec particules de latex revêtues. La seconde comprend les essais avec réactifs marqués tels que le dosage radioimmunologique et le dosage immunologique avec liaison à une enzyme.

Les essais du type précipitation présentent l'avantage d'être effectués manuellement et d'être disponibles dans le commerce sous forme de trousses à utilisation unique, qui sont lues visuellement et qui ne nécessitent pas d'instrument. La lecture d'un dosage immunologique du type précipitation est habituellement exprimée en tant que présence ou absence de réaction d'agglutination pour chacune d'un ensemble de dilutions connues de l'échantillon d'essai ou de l'antigène compétitif. Les inconvénients des essais du type précipitation sont qu'ils sont beaucoup moins sensibles que les dosages avec réactif marqué, qu'ils nécessitent des opérations d'incubation prolongées et qu'ils sont sensibles à des erreurs subjectives lors de l'identification visuelle d'une réaction de précipitation.

Les dosages immunologiques avec réactif marqué sont quantitatifs et très sensibles, mais ils présentent néanmoins certains inconvénients. Les dosages radioimmunologiques utilisent des traceurs radioactifs et nécessitent, par conséquent, l'utilisation d'un détecteur de rayonnement gamma. Les traceurs radioactifs ont une courte durée de vie au stockage, ils constituent un danger

pour la santé du technicien et ils ont été soumis à une législation restrictive. Les dosages avec immunoabsorbant lié à une enzyme (méthode ELISA) utilisent des réactifs marqués avec une enzyme. L'enzyme est détectée par sa réaction avec un substrat en donnant un produit pouvant être facilement mesuré (par exemple par réaction colorée). La méthode ELISA ne nécessite pas de produits radioactifs et utilise des réactifs à longue durée de vie au stockage.

Le dosage ELISA commence par la liaison d'un réactif de référence avec un support en phase solide, tel que le fond d'un puits en matière plastique. On fait réagir le fluide testé, mélangé au réactif marqué par une enzyme, avec le réactif de référence lié. Au bout d'un certain nombre d'opérations de dilution, d'incubation et de lavage (pouvant aller jusqu'à 14), les réactifs liés et libres sont séparés et une réaction colorée s'amorce. L'intensité de la couleur qui se forme à différents taux de dilution successifs fournit la mesure quantitative. La méthode ELISA normale demande 4 à 12 heures. En conséquence, les principaux inconvénients de la méthode ELISA sont le grand nombre d'opérations de dilution, d'incubation et de lavage qu'elle nécessite, qui demandent beaucoup de temps et qui sont sujettes à des erreurs.

Le dispositif de l'invention est utilisé pour surmonter les difficultés associées au type de dosage décrit ci-dessus. Plus précisément, son utilisation conduit à une méthode ELISA améliorée n'exigeant pas d'opérations de dilution et de lavage et nécessitant une courte période d'incubation. Le dosage s'utilise sous forme d'un ruban d'essai, multicouches, sec, qui donne lieu à une réaction colorée lorsqu'il est exposé directement au liquide testé. Le ruban réalise automatiquement les opérations de dilution nécessaires à la mesure quantitative et sépare l'anticorps lié de l'anticorps libre. La réaction colorée peut être lue visuellement ou à l'aide d'un

instrument tel qu'un spectrophotomètre. En outre, le dispositif de l'invention peut être fabriqué sous la forme de ruban et être utilisé sous forme d'un bâtonnet à immerger permettant de détecter rapidement la présence d'un antigène tel qu'un médicament ou une hormone dans l'urine. Comme exemple d'applications particulières, on pourrait citer la détection rapide d'un surdosage de médicament en salle d'urgences, un test de grossesse à domicile. La présente invention peut être utilisée pour déterminer la présence d'antigènes tels que le virus de la rubéole.

Selon l'un de ses aspects, l'invention concerne un dispositif pour déterminer la présence d'antigènes, comprenant une première zone contenant des antigènes et des anticorps liés à une enzyme, qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits anticorps étant situés dans ladite première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils ont réagi avec des antigènes traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels antigènes, et une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits anticorps liés à une enzyme pour produire une réaction colorée révélant la présence desdits anticorps.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé unique pour déterminer la présence d'antigènes dans un fluide biologique, consistant à mettre en contact ledit fluide avec un dispositif ou une matrice comportant une première zone contenant des antigènes et des anticorps liés à une enzyme, qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits anticorps étant situés dans cette première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone

lorsqu'ils réagissent avec des antigènes traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels antigènes, et une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits anticorps liés à une enzyme pour produire une réaction colorée qui indique la présence desdits anticorps ; à laisser ledit fluide imprégner ce dispositif ou cette matrice ; et à observer la présence ou l'absence de variations de couleur dans cette seconde zone pour ainsi déterminer la présence ou l'absence dans ledit fluide de l'antigène à doser.

La figure 1 est un diagramme illustrant le dispositif 10 de l'invention qui est constitué de 3 couches distinctes 12, 14 et 16. Les couches 12 et 14 constituent la première zone 18. La couche 16 constitue la seconde zone 20. Le dispositif 10 est représenté placé sur un élément de support 22. La couche 12 est faite d'un matériau poreux dans lequel sont dispersés des antigènes solubles 24 liés à une enzyme. La couche 14 est également formée d'un matériau poreux et des antigènes 26 y sont liés. La couche 16 est aussi constituée d'un matériau poreux et contient un réactif lié 17 capable de développer une couleur, c'est-à-dire une substance qui réagit avec une enzyme en produisant une couleur.

La figure 2 est un diagramme illustrant le procédé de l'invention utilisant le dispositif de la figure 1. Plus précisément, un fluide indiqué globalement par la référence 28, est appliqué sur la surface 30 de la couche 12. A mesure que le fluide diffuse dans la matrice, l'antigène libre 32 vient au contact des anticorps 24 liés à une enzyme et se combine avec ceux-ci. Après une courte période d'incubation, les anticorps liés à une enzyme présentant des sites de reconnaissance

saturés diffusent librement dans la première zone 18 et atteignent la seconde zone 20 (ou couche 16) où l'enzyme réagit avec le réactif capable de développer une couleur pour produire une couleur distincte qui révèle la présence d'antigène dans le fluide appliqué.

La figure 3 est un diagramme illustrant le procédé de l'invention utilisant le dispositif de la figure 1 et montrant ce qui se produit lorsque le fluide d'essai est exempt d'antigènes. Plus précisément, un fluide indiqué globalement en 34 est appliqué sur la surface 30 de la couche 12. A mesure que le fluide diffuse dans la couche 12 de la matrice, les anticorps 24 liés à une enzyme se solubilisent et passent dans la couche 14 où ils entrent en contact avec les antigènes liés 26 et se fixent sur ceux-ci. En conséquence, aucun anticorps lié à une enzyme n'atteint le réactif 17 capable de développer une couleur dans la couche 16 (seconde zone 20) et on n'observe aucune variation de couleur. Cela indique bien sûr qu'aucun antigène n'était présent dans le fluide 34.

La figure 4 illustre un autre mode de réalisation de l'invention dans lequel le dispositif ou la matrice 11 est constitué de deux couches distinctes 36 et 38. Dans ce cas, la couche 36 est la première zone 40 contenant l'antigène de référence lié 44 qui est combiné à l'anticorps 46 lié à une enzyme. La couche 38 est la seconde zone 42 et contient le réactif 17 capable de développer une couleur.

Comme le montre la figure 5, lorsque le fluide d'essai 48 contient suffisamment d'antigène libre 50 pour qu'il entre en compétition avec l'antigène lié 44, l'anticorps lié à une enzyme passe dans la zone 42 et diffuse vers le bas de celle-ci pour produire une réaction colorée 52.

Inversement, comme le montre la figure 6, lorsque le fluide d'essai 54 est exempt d'antigène, aucune compétition n'a lieu et par conséquent, aucun anticorps lié à une enzyme ne diffuse dans la seconde zone 42 et il ne se produit aucune réaction colorée.

La présente invention est basée sur le principe de la compétition entre les antigènes liés et libres pour atteindre un nombre déterminé de sites de reconnaissance sur un anticorps marqué par une enzyme. Elle fournit un procédé amélioré pour réaliser l'essai du type ELISA. Les réactifs du dosage sont imprégnés sur un ruban d'essai à plusieurs zones. On laisse l'échantillon liquide à tester diffuser passivement dans le ruban d'essai. Les antigènes liés et libres se séparent automatiquement au cours de la diffusion. Cette séparation résulte du fait que l'antigène de référence de la phase solide est immobilisé dans une première zone séparée d'une seconde zone contenant le substrat d'enzyme. On laisse l'anticorps soluble lié à une enzyme qui présente des sites de reconnaissance, se mélanger à l'échantillon d'essai et diffuser à travers les couches. Les antigènes solubles dans l'échantillon d'essai entrent en compétition avec l'antigène de référence immobilisé pour se combiner à l'anticorps lié à une enzyme. Par conséquent, la quantité finale d'anticorps lié à une enzyme ayant atteint la seconde zone contenant le substrat dépend de la concentration de l'antigène à doser dans l'échantillon. Le substrat présent dans le ruban d'essai réagit avec l'enzyme en produisant une réaction colorée.

Pour obtenir une mesure quantitative, le ruban d'essai comporte plusieurs régions séparées contenant chacune une quantité différente d'antigène de référence immobilisé. La position du point de virage de la couleur sur le ruban d'essai dépend par conséquent de la

concentration de l'antigène dans l'échantillon d'essai. Comme mentionné précédemment, le dispositif de l'invention comprend une première zone qui contient un antigène lié et un anticorps spécifique lié à une enzyme et une seconde zone qui contient un réactif capable de développer une couleur ou un substrat. Les anticorps liés à une enzyme sont placés dans la première zone de telle manière qu'ils puissent en être éliminés lorsqu'ils ont réagi avec de l'antigène non lié pénétrant ou traversant celle-ci mais qu'ils ne soient pas éliminés de la première zone en l'absence de tels antigènes.

Selon une mise en oeuvre préférée de l'invention, le dispositif de dosage immunologique est un stratifié de trois couches de matrice poreuses (voir figure 1). La première couche poreuse est imprégnée d'un anticorps spécifique lié à une enzyme. La seconde couche poreuse contient un antigène de référence immobilisé (lié). L'antigène est du type reconnu spécifiquement par l'anticorps dans la première couche poreuse. La troisième couche contient un substrat produisant une couleur qui réagit avec l'enzyme liéeà l'anticorps. La mise en oeuvre du dispositif s'effectue de la façon suivante (voir figures 2 et 3).

On met en contact l'échantillon de fluide contenant l'antigène à doser avec la première couche. L'antigène libre dans l'échantillon d'essai diffuse dans la seconde couche puis dans la troisième couche. L'antigène libre dans l'échantillon entre en compétition avec l'antigène de référence lié immobilisé dans la seconde couche pour se combiner à l'anticorps lié à une enzyme. Si l'anticorps lié à une enzyme se combine à l'antigène libre, il diffusera librement dans la troisième couche et produira une réaction colorée. Si l'échantillon de fluide ne contient pas d'antigène, tous les anticorps liés à une enzyme posséderont des sites de liaison libres et se combineront avec l'antigène immobilisé présent dans la seconde couche. L'anticorps lié à une enzyme qui se combine à l'antigène immobilisé dans la

seconde couche, ne diffusera pas dans la troisième couche et aucune réaction colorée ne se produira. La différence de quantité de substrat dégradé (et l'intensité de la couleur produite) est proportionnelle à la concentration en antigène de l'échantillon d'essai. Pour une quantité donnée d'anticorps marqué par une enzyme dans la première couche, la sensibilité du dispositif est déterminée par la quantité d'antigène de référence présente dans la seconde couche. D'une manière générale, un dispositif de dosage contient une série de composites stratifiés, contenant chacun une quantité différente d'antigène de référence. La série de concentrations en antigène de référence devra être déterminée préalablement de façon à couvrir une gamme de sensibilité appropriée à la solution à doser. On notera que dans le ruban d'essai de type ELISA, une réaction colorée positive indique la présence de l'antigène à doser.

Les substances utilisées pour fabriquer le dispositif de l'invention sont bien connues dans la technique. Cependant, on a trouvé dans la pratique qu'il était souhaitable de fabriquer les zones ou les couches du dispositif préféré à partir de fibres tissées telles que du papier de nitrocellulose ou de diazobenzyloxyméthyle (DBM). Le papier de nitrocellulose fixe directement les protéines et on a pu montrer qu'il était utilisable pour immobiliser des antigènes. Les matrices de DBM fixent l'ADN, l'ARN et les protéines par des liaisons covalentes avec le groupe diazonium. On peut en outre utiliser un gel poreux tel que le polyacrylamide, l'agarose, ou le collagène. L'antigène peut être piégé dans les pores du gel, ou être réticulé avec le gel par l'intermédiaire des groupes amino du ligand et des groupes carboxyliques se trouvant sur la matrice.

On peut également employer des particules ou des billes contenant le ligand lié piégé à l'intérieur d'une matrice de cellulose ou d'une matrice de fibres de matière plastique. Comme exemple satisfaisant, on peut citer des billes de polyacrylamide de 5-10 microns de diamètre, à la surface desquelles l'antigène est lié par l'intermédiaire d'une liaison peptidique. Les billes sont piégées dans une matrice de filtre de cellulose d'une taille de pores de 1-2 microns.

Les substrats ou les réactifs développant une couleur appropriée sont bien connus dans la technique. A cet égard, un certain nombre de types divers d'enzymes purifiés sont couramment utilisés comme réactifs marqués dans les dosages immunologiques tels que le test ELISA. Parmi ceux-ci on citera la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, et la béta-galactosidase. Cependant, la présente invention ne se limite pas à l'utilisation de ces enzymes pour marquer l'anticorps ou l'antigène. L'enzyme utilisé pour marquer l'anticorps peut produire une couleur dans la seconde zone du dispositif de dosage en réagissant directement ou indirectement avec le réactif capable de développer une couleur. A titre d'exemple, des substrats bien connus dans la technique tels que la diaminobenzidine ou le p-nitrophénylphosphate réagissent avec la peroxydase de raifort en présence d'eau oxygénée en produisant une couleur marron à noire. Selon un mode de réalisation de l'invention, on ajoute de l'eau oxygénée par voie exogène lorsqu'on utilise le dispositif. En variante, la zone de formation de couleur lyophilisée peut contenir de la glucose oxydase liée et la première zone peut contenir du glucose. Lors de l'utilisation du dispositif, le glucose se trouvant dans la première zone diffuse dans la seconde zone et donne naissance à de l'eau oxygénée par réaction avec la glucose oxydase.

L'enzyme liée à l'anticorps peut produire une

couleur dans la seconde zone par voie indirecte, en rendant par exemple perméable cette zone. A titre d'exemple, de ce procédé entrant dans le cadre de l'invention, on peut utiliser une collagénase à haut degré de purification comme enzyme lié à l'anticorps. Cet enzyme dégrade le collagène en peptide de petite dimension. Pour déceler la collagénase de marquage, on sépare 2 réactifs qui se combinent en donnant une couleur au moyen d'une barrière constituée d'une matrice de collagène. La présence de l'anticorps marqué par la collagénase est décelée du fait que la collagénase dégrade la barrière de collagène et permet aux réactifs séparés de se mélanger et d'engendrer une couleur. Comme collagénase appropriée, on citera celle obtenue à partir de clostridium histolyticium purifié par des moyens bien connus dans la technique. Comme matrice de collagène appropriée, on citera celle obtenue à partir de collagène bovin de type I en triple hélice (natif) ou dénaturé (gélatine).

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention.

EXEMPLE 1.

Test : mode de réalisation de l'invention à trois couches pour la détection de grossesses.

Substances utilisées :

a) antigène : gonadotrophine chorionique humaine (hCG)
b) anticorps : antisérum de lapin agissant sur la hCG humaine
c) enzyme liée à l'anticorps : peroxydase de raifort
d) substrat d'enzyme produisant une réaction colorée : diaminobenzidine
e) substance de matrice constituant les couches poreuses : nitrocellulose.

Mode opératoire :

Stade 1. Préparation d'une couche contenant le réactif, capable de développer une couleur : on découpe des feuilles de matrice de nitrocellulose d'une épaisseur

de 0,2 mm en ruban de 2 cm de large et de 10 cm de long. On trempe les feuilles pendant 30 min dans une solution à 0,1 mg/ml de diaminobenzidène dans de l'eau distillée. On congèle ensuite les feuilles en les recouvrant de pastilles de glace carbonique. On lyophilise les feuilles congelées dans un lyophilisateur classique.

Stade 2. Préparation d'une couche contenant l'antigène : on solubilise l'antigène dans une solution saline tamponnée par du phosphate (PBS) à une concentration de 5,0 U.I./ml et complétée de façon à obtenir la série de dilutions suivante :

1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, et 1:100.

Huit groupes de feuilles de nitrocellulose sont chacune trempées dans une dilution différente de la solution d'antigène pendant 30 min à 4°C. Toutes les feuilles sont ensuite trempées dans une solution à 1 % d'albumine sérique bovine dans une solution saline tamponnée par du phosphate pendant 2 heures à 4°C pour saturer tous les sites libres de liaison des protéines sur la nitrocellulose (Tobin et al Proc. Natl.Acad. of Sci. 76 4350-4354, 1979).

Stade 3. On lyophilise ensuite les feuilles comme décrit ci-dessus pour préparer la couche contenant l'anticorps lié à l'enzyme : on conjugue la peroxydase avec l'anticorps par le procédé classique au périodate de Wilson et Nakane (1978 dans W. Knapp et al (éd.) Immunofluorescence and Related Techniques, Elsevier Co., Amsterdam, p. 215-225). Après avoir purifié le conjugué par des procédés classiques, on le met en solution saline tamponnée au phosphate à une concentration de 1 mg/ml. On détermine la concentration d'anticorps lié à une enzyme à imprégner dans la couche en diluant la solution d'anticorps lié à une enzyme jusqu'à ce qu'une gouttelette de 20 microlitres appliquée sur la surface de la feuille de nitrocellulose contenant l'antigène immobi-

lisé à une dilution de 1:32, présente une liaison complète de tous les anticorps à l'antigène immobilisé (préparation d'une courbe de dilution étalon). On imprègne des rubans de papier buvard de cellulose de cette concentration d'anticorps lié à une enzyme et on les lyophilise de la façon décrite ci-dessus au stade 1.

Stade 4. Préparation d'un stratifié à 3 couches : on découpe à partir des rubans des carrés de 1 cm de chacune des couches lyophilisées. Le support solide est un ruban de matière plastique transparente de polycarbonate de 10 cm x 1 cm d'une épaisseur de 0,1 mm. On colle sur le support de plastique 8 carrés de nitrocellulose contenant le substrat produisant la couleur au moyen d'une colle à base de latex. Par dessus ces carrés, on colle les feuilles contenant l'antigène en appliquant la colle au latex sur le pourtour. On utilise les 8 concentrations d'antigène différentes. Enfin, on colle par-dessus les couches d'antigène, les couches d'anticorps lié à l'enzyme.

Stade 5. Pour effectuer le dosage, on applique 50 microlitres de la solution d'essai à la surface de la couche supérieure. La solution d'essai est constituée d'un antigène étalon dans une solution saline tamponnée au phosphate à pH 7,4 avec 0,1 % d'eau oxygénée. La sensibilité du dosage est de 0,3 UI de hCG et produit une réaction colorée pour la dilution 1:32 de l'antigène immobilisé.

Résultats.

On compare la sensibilité du ruban d'essai de type ELISA fabriqué de la façon décrite ci-dessus à celle d'une réaction d'hémagglutination étalon. L'échantillon d'essai est constitué par de l'urine humaine mise en commun provenant de 6 patientes chez qui on avait préalablement décelé une grossesse.

Dilution de l'échantillon d'urine	Quantité estimée de hCG détectée	Ruban ELISA	Hémagglutination classique
1:1	2,5 UI	(+)	(+)
1:2	1,2 UI	(+)	(+)
1:4	0,6 UI	(+)	(-)
1:8	0,3 UI	(+)	(-)
1:16	0,01 UI	(-)	(-)

La sensibilité du ruban ELISA est supérieure à celle de la réaction d'hémagglutination classique.

EXEMPLE 2.

Essai : a) pour déterminer l'instant de formation d'une couleur pour diverses concentrations d'anticorps lié à une enzyme imprégnant la première couche du mode de réalisation à trois couches.

b) pour déterminer la possibilité de réaliser la détection de l'antigène de l'hépatite B humaine (HBA).

Mode opératoire.

Le ruban d'essai est réalisé par des procédés identiques à ceux de l'exemple 1. La première couche contient la matrice de cellulose lyophilisée imprégnée d'anti-HBA conjugué avec de la peroxydase aux dilutions suivantes : 1/2, 1/5, 1/50, 1/225, 1/625, 1/3125. Dans l'expérience a), la seconde couche ne contient pas d'antigène. Dans l'expérience b), la seconde couche contient du HBA lié à une concentration de 500 nanogrammes par cm^2. La troisième couche contient un substrat de DAB préparé de la façon décrite dans l'exemple 1 pour détecter la hCG.

Résultats.

Expérience a).

L'échantillon d'essai est constitué par du sérum humain normal dilué à 1/10 dans une solution saline tamponnée par du phosphate contenant 0,1 % d'eau oxygénée.

Réaction colorée

Dilution	Temps : 10 sec	30 sec	1 min
1/2	M très foncé - N	id.	id.
1/5	M très foncé - N	id.	id.
1/50	M - N	id.	id.
1/225	M	M foncé	id.
1/625	M clair	M	M foncé
1/3125	pas de couleur	M très clair	M clair

Abréviations : M = marron
N = noir.

Conclusion : la concentration optimale de l'anticorps lié à une enzyme est de 1/625 lorsque la seconde couche contient 500 nanogrammes de HBA par cm^2. La possibilité de réaliser la détection de HBA est démontrée par le fait que l'antigène libre entre en compétition avec l'antigène de référence lié à une concentration de 1/625.

Expérience (b).1

Détermination de la concentration optimale maximale d'anticorps lié à une enzyme dans la première couche et totalement lié à l'antigène de référence dans la seconde couche lorsque l'échantillon d'essai est exempt d'antigène.

Dilution de l'anti - HBA conjugué avec une enzyme dans la première couche	Réaction colorée à 1 min
1/5	M
1/50	M clair
1/225	M très clair
1/625	Pas de couleur (liaison complète à l'antigène de référence).
1/3125	Pas de couleur

Expérience (b).2

On choisit une dilution de 1/625 (à partir du tableau (b) 1 ci-dessus) de conjugué pour détecter le HBA à 100 nanogrammes/ml.

Echantillon d'essai	Réaction colorée	
	30 sec	1 min
HBA présent	M clair	M
HBA absent	pas de couleur	pas de couleur

La technique de l'invention peut aussi bien s'appliquer à la détection d'anticorps qu'à celle des antigènes. Il suffit pour cela d'inverser les rôles de l'antigène et de l'anticorps. Pour détecter des anticorps, l'antigène est marqué par une enzyme et l'anticorps de référence est immobilisé dans la première zone. L'antigène marqué par une enzyme se lie à l'anticorps immobilisé dans la première zone en l'absence d'anticorps compétitif dans l'échantillon d'essai, et ne diffuse pas dans la seconde zone pour donner une couleur. Si des anticorps sont présents dans l'échantillon d'essai, ils entrent en compétition avec les anticorps de référence immobilisés. Dans ce cas, une réaction colorée positive indique la présence d'anticorps dans l'échantillon d'essai.

Lorsque la présente invention est appliquée à la détection d'anticorps, on utilise un dispositif qui comprend une première zone contenant des antigènes liés à une enzyme et des anticorps qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits antigènes étant situés dans ladite première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils réagissent avec des anticorps pénétrant ou traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels anticorps ; et une seconde zone contenant une substance capable de réagir, soit directement, soit indirectement, avec lesdits antigènes liés à une enzyme

en produisant une réaction colorée qui indique la présence desdits antigènes.

REVENDICATIONS

1. Dispositif pour déterminer la présence d'antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend :
- une première zone contenant des antigènes et des anticorps liés à une enzyme, qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits anticorps étant situés dans ladite première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils réagissent avec des antigènes traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels antigènes, et
- une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits anticorps liés à une enzyme en produisant une réaction colorée qui indique la présence desdits anticorps.

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première et la seconde zones sont contigües.

3. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite première zone contient des anticorps liés à une enzyme qui sont combinés à des antigènes spécifiques.

4. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite première zone est constituée d'au moins deux couches individuelles, l'une de ces couches contenant des anticorps liés à une enzyme et l'autre couche contenant l'antigène spécifique immobilisé dans cette couche.

5. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite première zone est fabriquée à partir de nitrocellulose.

6. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite première zone est fabriquée à partir d'un gel de polymère poreux.

7. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite première zone est fabriquée à partir de particules contenant de l'antigène ou de l'anticorps immobilisé piégé dans une matrice fibreuse.

8. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite seconde zone est fabriquée à partir de nitrocellulose.

9. Procédé pour déterminer la présence d'antigènes dans un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à mettre en contact un fluide dans lequel on veut déterminer la présence ou l'absence d'antigène, avec un dispositif comportant une première zone contenant des antigènes et des anticorps liés à une enzyme qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits anticorps étant situés dans cette première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils réagissent avec des antigènes traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels antigènes, et une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits anticorps liés à une enzyme en produisant une réaction colorée qui indique la présence desdits anticorps ;
- à laisser ledit fluide imprégner le dispositif ; et
- à observer la présence ou l'absence d'une variation de couleur dans cette seconde zone pour ainsi déterminer la présence ou l'absence de l'antigène à doser dans ledit fluide.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que lesdites première et seconde zones sont contigües.

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite première zone contient des anticorps liés à une enzyme qui sont combinés à des antigènes spécifiques.

12. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite première zone est constituée d'au moins deux couches individuelles, l'une de ces couches contenant des anticorps liés à une enzyme, et l'autre couche contenant l'antigène spécifique immobilisé dans cette couche.

13. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite première zone est fabriquée à partir de nitrocellulose.

14. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite seconde zone est fabriquée à partir de nitrocellulose.

15. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'antigène présent dans ce dispositif est la gonadotrophine chorionique humaine.

16 Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'antigène présent dans ce dispositif est l'antigène de l'hépatite.

17. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'antigène présent dans ce dispositif est une protéine du virus de la rubéole.

18. Dispositif pour déterminer la présence d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend :
- une première zone contenant des antigènes liés à une enzyme et des anticorps qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits antigènes étant situés dans ladite première zone de telle manière qu'il soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils réagissent avec des anticorps traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels anticorps ; et

- une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits antigènes liés à une enzyme en produisant une réaction colorée qui indique la présence desdits antigènes.

19. Procédé pour déterminer la présence d'anticorps dans un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à mettre en contact un fluide dans lequel on veut déterminer la présence ou l'absence d'antigènes, avec un dispositif comportant une première zone contenant des antigènes liés à une enzyme et des anticorps qui sont capables de réagir immunologiquement avec lesdits antigènes, lesdits antigènes étant situés dans ladite première zone de telle manière qu'ils soient éliminés de cette première zone lorsqu'ils réagissent avec des anticorps traversant cette première zone, mais qu'ils ne soient pas éliminés de cette première zone en l'absence de tels anticorps, et une seconde zone contenant une substance capable de réagir avec lesdits antigènes liés à une enzyme en produisant une réaction colorée qui indique la présence desdits antigènes ;
- à laisser ledit fluide imprégner ce dispositif ; et
- à observer la présence ou l'absence d'une variation de couleur dans ladite seconde zone, pour ainsi déterminer la présence ou l'absence des anticorps à doser dans ledit fluide.

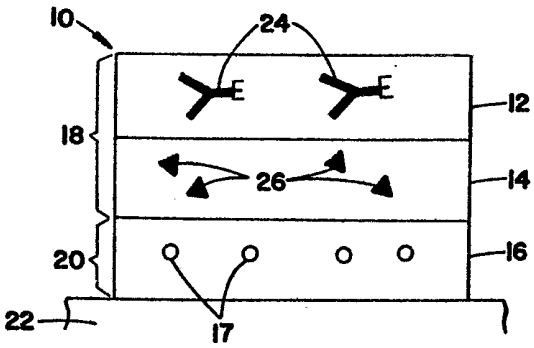

FIG. 1

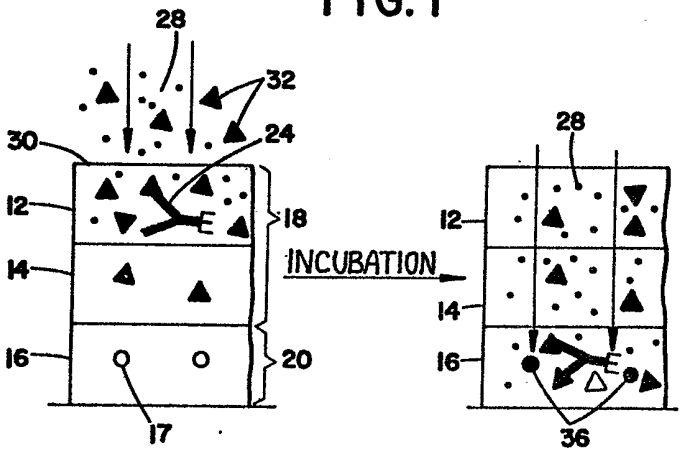

FIG. 2

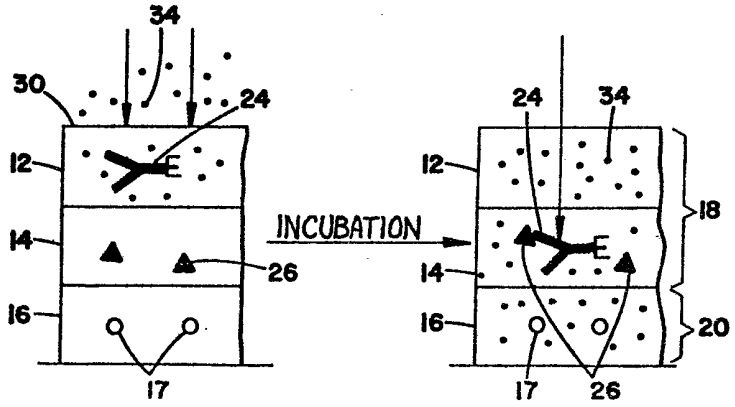

FIG. 3

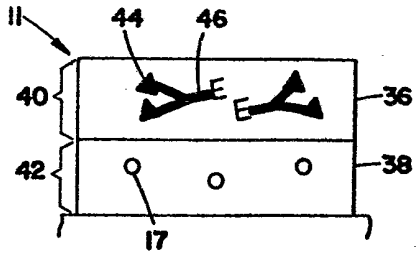

FIG. 4

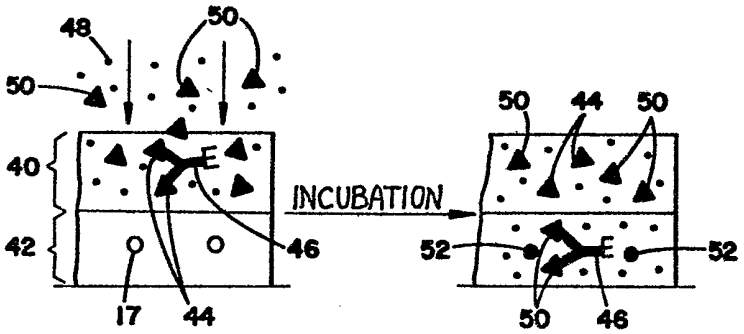

FIG. 5

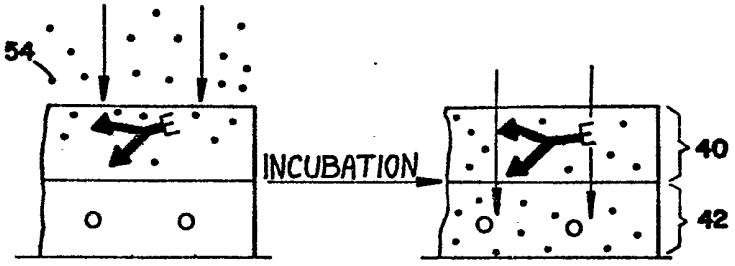

FIG. 6