

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 21.01.99.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.07.00 Bulletin 00/30.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : ADIATEC SA Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : LESSER JOEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ DISPOSITIF DE TEST ET PROCÉDE POUR LA QUANTIFICATION DE RESULTATS OBTENUS PAR DES
METHODES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES.

⑤⑦ L'invention concerne un dispositif de test et un procé-
dé pour la quantification de résultats obtenus par des méth-
odes immunochromatographiques permettant d'affecter
des valeurs ou domaines de valeurs à des intensités de co-
loration de signal du résultat, par comparaison de l'intensité
de coloration du résultat avec celle d'un témoin interne de
fonctionnement. L'intensité de coloration du signal du té-
moin interne de fonctionnement aura été ajustée et la cor-
respondance entre cette intensité dite de référence
observée pour la coloration du signal du résultat et une va-
leur ou plage de valeurs de l'élément recherché aura été dé-
terminée. Les critères de choix de cette intensité et la
méthode d'ajustement de cette intensité sont décrites dans
cette invention.

dans des trousse d'analyse est incluse.

Ce dispositif de test permet en particulier de différencier
trois domaines de valeurs de résultats: inférieures, voisines
et supérieures à l'intensité du témoin de fonctionnement, la
concordance entre ces domaines de résultats et des domai-
nes de valeurs quantitatives étant établie et définie lors
d'essais antérieurs. Ce dispositif de test est applicable par
exemple et de façon non limitative à la détection et à la dis-
tinction de différents taux d'anticorps spécifiques dans un
échantillon biologique. L'utilisation de ce dispositif de test



Il s'agit de protéger un dispositif de test original permettant de quantifier les résultats obtenus par des méthodes immunochromatographiques, c'est à dire d'affecter des valeurs ou plages de valeurs de l'élément recherché aux résultats obtenus par ces méthodes. Les méthodes
5 immunochromatographiques auxquelles s'applique la présente invention sont caractérisées par le fait de comprendre au moins un contrôle interne de fonctionnement ou témoin de fonctionnement.

Le dispositif de test, faisant appel à la lecture comparative du ou des résultats obtenus avec un ou des témoins de fonctionnement interne,
10 permet d'établir une correspondance entre des intensités de coloration de signal ou de signaux et des valeurs ou plages de valeurs de résultats. Ce dispositif de test permet en particulier d'affecter l'intensité de coloration d'un signal obtenu à une valeur ou plage ou domaine de valeurs quantitatives ou numériques, et donc de préciser le taux d'un
15 élément dans un échantillon.

Ce dispositif est utilisable pour toute détection d'un élément susceptible d'intervenir dans une réaction d'affinité avec un contre-élément.

Cette invention concerne principalement un dispositif de test pour l'affectation de valeur(s) quantitative(s) à un résultat de nature
20 qualitative: l'intensité de coloration d'un signal.

On entend par « élément », dans le cadre de cet exposé, toute substance, composition, particule capable d'intervenir dans un système ligand-affinant, notamment dans une réaction affine avec un « contre-élément ». La généralité donnée au mot « élément » s'étend donc également à
25 l'expression « contre-élément ». De façon non limitative, « élément » et « contre-élément » peuvent être constitués par un antigène et un anticorps mutuellement complémentaires, affins, ou vice - versa. Par exemple, ce dispositif de test permet d'estimer le taux d'une réponse humorale envers un ou des antigènes et/ou le taux d'un antigène
30 présent dans un échantillon.

L'invention présente est applicable à la recherche en biologie et dans le domaine du diagnostic médical, ainsi que dans tous les domaines des sciences de diagnostic et d'analyse, tels les sciences vétérinaires, agricoles, agro-alimentaires, alimentaires et d'expertises, où il est
35 nécessaire d'évaluer ou estimer le taux d'un élément, composé ou

substance. Elle est également applicable dans l'industrie, et à tout processus de détection qualitative utilisé industriellement.

Le procédé d'application de ce dispositif de test utilise la comparaison de l'intensité de coloration du signal du résultat avec celle(s) d'un ou de plusieurs témoins internes de fonctionnement que l'on aura ajustée lors
5 d'essais antérieurs.

La présente invention concerne un dispositif de test dont le but est de permettre l'étalonnage interne de tests unitaires destinés à la détection d'un ou de plusieurs éléments dans un échantillon. Plus spécifiquement,
10 l'invention concerne un dispositif et une méthode utilisant le ou les contrôles de fonctionnement desdits tests dans le but d'obtenir un ou plusieurs indicateurs référencés d'intensité de coloration ou d'abaque, lié(s) au fonctionnement des mêmes essais.

En particulier, ce dispositif de test original a pour finalité de permettre la
15 quantification des résultats obtenus avec les tests d'immunochromatographie par migration ou filtration sur membrane, utilisant un indicateur visuel coloré, qui peut être de l'or colloïdal, des billes de latex, toute substance particulière ou non, ou le produit d'une réaction enzymologique, et donnant une coloration pour l'indication du
20 résultat. Le dispositif de test, faisant appel à une méthodologie précise et aux techniques précédemment citées, permet d'établir une correspondance entre l'intensité de coloration du signal obtenu et des domaines de valeurs quantitatives de l'élément ou des éléments recherchés.

25 Les analyses utilisant l'affinité spécifique de réactifs ont montré leur grande utilité ces dernières années, tant dans le domaine de l'analyse biologique que pour d'autres applications. Plusieurs techniques utilisent ainsi l'affinité spécifique existant entre deux ou plusieurs réactifs: il s'agit de la technique 'sandwich', et de la compétition.

30 Ces méthodes utilisent un ou les deux membres de couple(s) d'affinité spécifique pour la détection et la détermination d'un ou plusieurs élément(s).

Toutes ces techniques ont la caractéristique d'utiliser un réactif fixé sur un support et un réactif de révélation libre. Selon la nature du test, le
35 réactif fixé sur le support peut être un anticorps, un antigène ou toute

substance membre d'un couple d'affinité spécifique. De même pour le réactif de révélation, qui présente de plus la particularité de ne pas être fixé à un support mais d'être composé au moins en partie d'une molécule indicatrice ou pouvant donné lieu à une réaction indicatrice. Les
5 marqueurs les plus couramment utilisés sont les colorants, les substances radioactives, les enzymes, les colloïdes d'or et les billes de latex.

De nombreuses formes de supports solides sur lequel un des membres d'un couple d'affinité est fixé, ont été décrits. Actuellement, les supports
10 les plus courants pour les RIAs et les ELISAs sont des tubes, plaques ou billes de polystyrène. Mais des filtres de papier, du verre et diverses matières plastiques ont été utilisé pendant longtemps.

Les essais radioimmunologiques (RIAs) et enzymatiques (ELISAs) sont connus et utilisés dans le monde entier. Plus récemment développés, les
15 tests immunochromatographiques ont pris et continuent à prendre une place de plus en plus importante dans le domaine du diagnostic. Ces tests utilisent principalement des membranes de diverses natures et compositions comme support solide.

Le développement de marqueurs non radioactifs et non enzymatiques ont
20 facilité l'usage des procédures immunologiques de diagnostic en dehors des laboratoires spécialisés, jusqu'au cabinet du médecin et même au domicile des patients. Ces procédures doivent être rapides et simples, apportant presque instantanément une aide au diagnostic. Le développement de tels tests s'est donc concentré, outre la nécessité
25 d'une sensibilité et d'une spécificité appropriées, sur l'amélioration de trois caractéristiques principales: la rapidité, la stabilité (à température ambiante), et la facilité d'emploi et de lecture des résultats.

Cependant, il est parfois utile ou nécessaire d'avoir un résultat quantitatif pour la précision d'un diagnostic ou le suivi d'une thérapie.
30 La seule avancée connue dans ce sens est l'apparition d'appareils de lecture par réflectométrie. Mais on perd alors deux caractéristiques intéressantes de ces tests: la simplicité, mais surtout l'absence d'instrumentation nécessaire pour la réalisation du test. De plus, le problème du choix d'une référence ou d'une courbe d'étalon permettant

d'établir la corrélation entre l'intensité de coloration d'un résultat et une ou des valeurs reste posé.

Dans *Immunochemistry - Practical applications in pathology and biology* (eds Polak J.M et Van Noorden S., 1986), il est décrit la préparation et
5 l'utilisation d'or comme marqueur coloré. L'absorption d'une substance réactive sur des colloïdes d'or est décrite par Geoghegan W. et Ackerman G. dans *J. Histochem. Cytochem.* (1977), 25, 1187. L'utilisation des colloïdes d'or pour la visualisation de réactions antigène - anticorps dans
10 des analyses utilisant le dépôt de réactifs immunologiques sur des membranes est décrit par Moeremans M. et coll. dans *J. Immunol. Meth.*(1984), 74, 353.

Les méthodes d'analyse immunochromatographique utilisent un support d'immunochromatographie à travers lequel va diffuser l'échantillon, soit de manière latérale et on parle de migration, soit de façon transversale et
15 on parle alors de filtration. Dans le cas des tests d'immunochromatographie par migration, les colloïdes d'or et les billes de latex sont généralement utilisés pour la révélation optique (colorée) du résultat, en tant que composants du réactif de révélation ou de coloration. Mais sont également utilisées des enzymes dont la réaction
20 avec un substrat produit directement ou indirectement une coloration associée à un produit coloré insoluble.

Selon la technique sandwich qui utilisent deux ligands de la molécule recherchée, un des ligands est fixé et l'autre couplé avec un indicateur permettant la visualisation du résultat, par coloration directe lorsqu'il
25 s'agit d'une substance colorée ou par l'apparition d'une coloration après une réaction enzymologique lorsqu'il s'agit d'une enzyme. Selon la technique de compétition, un seul ligand est utilisé ainsi que la substance recherchée ou son analogue; le ligand est alors fixé ou libre et couplé avec l'indicateur coloré ou enzymatique, la substance recherchée
30 ou son analogue étant inversement fixé ou couplé.

L'immunochromatographie a fait l'objet de nombreux dépôts de brevets dont EP 0 306 772 et EP 0 262 328 d'Abbott (marque déposée), EP 0 286 371 et EP 0 183 442 de Syntex (marque déposée), EP 0 276 152 de Synbiotics Corporation (marque déposée), EP 0 296 724 de Quidel
35 (marque déposée) et WO 88/00322 d'Unilever (marque déposée). On peut

également cité les brevets US n° 4. 366.241 de Tom et al., US n° 4.632.901 de Valkirs et al., US n° 4.522.923 de Deutsch A. et Platt H.A., WO 8606488 de Barnett B., EP 0 022 669 de Graham H.A. et coll., US n°4. 094.647, 4. 235.601 et 4. 361.537 de Deutsch M.E. et Mead L.W.,
5 FR 2537724 de Friedenbergr R.M., EP 0206779 de Lipp V. et Buck R.L., EP 0189925 de Deutsch A. et coll., WO 84/02397 de Friedenbergr, US n° 3. 893.808 de Campbell, et US n°3.895.914 d'Alberly et coll.

L'immunochromatographie sur bandelette contenant un conjugué immunoréactif particulière est décrit dans le brevet Rosenstein EP 284
10 232 de Becton Dickinson (marque déposée).

L'immunochromatographe (bandelette) sous étui plastique à deux fenêtres: puits échantillon et fenêtre de lecture, est décrit dans le brevet EP 291 194 d'Unilever (marque déposée).

D'autres brevets concernent le réactif de révélation utilisé, comme les
15 brevets Leuving d'Akzona EP 7654 (US 4 313 734), EP 398 913 (WO 89/06801) de Nycomed (marque déposée), EP 0 250 137 et 0 258 963 d'Ortho Diagnostic System (marque déposée), EP 0 158 746 et 0 293 947 de Janssen Pharmaceutica (marque déposée), et EP 0 310 872 d'Hygeia Sciences, pour l'utilisation de colloïdes d'or, les brevets pour l'utilisation
20 de billes de latex étant également nombreux (US N°4.434.150, N°31.712, N° 4.478.914, N° 4.141.965, N° 4.210.622, N°4.331.649, N° 4.582.810). On peut aussi citer les brevets US N°4.803.154, N°4.446.232, N°4.752.572 pour la révélation enzymatique et l'utilisation d'un ligand couplé à une enzyme.

25 Ces brevets concernent des dispositifs, méthodes et applications permettant de procéder à la détection d'un élément, et donc conduisant à l'obtention d'un résultat uniquement qualitatif, indiquant la présence ou l'absence dudit élément dans un échantillon.

Ces méthodes immunochromatographiques sont principalement utilisées
30 dans des tests unitaires permettant l'analyse rapide d'un seul échantillon. Ces tests présentent le résultat de l'analyse sous la forme d'un spot ou d'une ligne visible ou invisible selon le résultat après un temps généralement inférieur à 20 minutes. La validité du résultat est généralement assurée par un contrôle de fonctionnement interne.

35 Ces tests sont composés de 3 parties distinctes:

1. Une première zone réactive, appelée réservoir, composée d'une membrane prévue pour recevoir un échantillon de fluide à tester et contenant une moitié de paire d'affinité spécifique du ligand recherché et couplée à un réactif permettant la mise en évidence de la présence du
5 ligand recherché. Cette membrane est composée d'un matériau pouvant jouer le rôle de contenant (par exemple cellulose ou dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples) et
10 présentant avec ou sans traitement des propriétés de faible adsorption des molécules biologiques.

2. Une deuxième zone réactive, appelée support de la réaction, composée d'une membrane activée présentant des propriétés d'adsorption sélective de molécules (par exemple par interactions ioniques, par interactions
15 hydrophobes, par affinité, par immunoaffinité) et des propriétés de migration et de capillarité permettant à l'échantillon à tester de se déplacer et ainsi d'entraîner l'élément à doser à travers les zones réactives. Cette membrane peut ou non être composée de deux parties distinctes et contiguës ayant ou non les propriétés énoncées ci-dessus.
20 Cette membrane peut être composé d'un ou plusieurs matériaux présentant les propriétés énoncées ci-dessus (par exemple cellulose ou dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de
25 couches multiples).

3. Une troisième partie, appelée absorbant, dont le rôle est de provoquer et/ou de favoriser le flux à travers les deux parties précédentes. Cet élément peut être composé d'un matériau ayant des propriétés hygroscopiques (par exemple ouate de cellulose ou de dérivés de
30 cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples)

Ces trois parties sont placés de façon contiguë et sans discontinuité, souvent dans un module en matière plastique laissant apparaître deux zones de la membrane réactive par l'intermédiaire d'une fenêtre:

- . la première zone constitue la zone test montrant le résultat de l'analyse.
- 5 . la deuxième constitue la zone contrôle prouvant que le test a été réalisé dans de bonnes conditions: témoin de fonctionnement.

Dans le cas des tests de séries, il est généralement fourni un ou des échantillons positifs et négatifs permettant de vérifier le bon fonctionnement des tests en fournissant simultanément une courbe de
10 calibrage/étalonnage ou au minimum un point de référence. Cela permet de quantifier les résultats obtenus.

Cette méthode de calibrage n'est pas utilisable pour les tests unitaires. Il n'est en effet pas envisageable d'utiliser un test pour l'établissement d'un référentiel pour chaque test d'analyse, dont un des intérêts est d'être
15 pratiqué de façon unitaire.

Ces tests unitaires ont donc la particularité de présenter un contrôle de fonctionnement interne. Sur le même test, on obtient le résultat de l'analyse et le résultat du contrôle de fonctionnement. Ces résultats, de nature qualitative et à lecture le plus souvent visuelle, se présentent
20 sous forme de lignes, points ou caractères colorés, par exemple de couleur rouge pour les tests utilisant l'or colloïdal.

Généralement ces tests utilisent la capture directe du réactif de révélation (complexe composé d'une substance affine et d'un indicateur coloré ou d'une enzyme) pour le contrôle du fonctionnement du test.

25 Dans le but d'assurer l'utilisateur du fonctionnement correct du test, le signal est généralement prévu pour avoir une intensité maximale, et donc une visibilité optimale.

Certains producteurs de tels tests unitaires ont tenté de fournir sans succès des gammes étalon ou des abaques d'intensité de couleur afin de
30 quantifier les résultats obtenus. L'utilisation de tels abaques se heurte à la difficulté d'une part de son établissement dans des conditions données, mais surtout à la variabilité des conditions opératoires et des échantillons. En effet, les réactions immunologiques de part leur nature varient en fonction des conditions opératoires (température, dépôt de
35 l'échantillon, etc.), mais surtout de la nature et qualité de l'échantillon

(pH, viscosité, présence de substances plus ou moins interférentes, inhibitrices ou accélératrices de réactions d'affinité, etc.).

Or la réaction du contrôle de fonctionnement étant de même nature que celle de l'analyse, elle est donc affectée de manière analogue par ces
5 variables.

Il s'agit ici de la description d'un dispositif de test permettant d'utiliser ce contrôle de fonctionnement pour l'établissement d'un indicateur d'intensité ou d'un élément d'abaque. Par référence à l'intensité de coloration du signal du témoin de fonctionnement, on peut alors définir
10 trois niveaux d'intensité de coloration du signal du résultat correspondant à trois domaines de valeurs positives du résultat d'analyse: supérieures à , équivalentes ou voisines de, et inférieures à une valeur ou plage de valeurs choisie.

L'utilisation d'un indicateur interne pour le calibrage assure la validité
15 de la correspondance. En effet, l'indicateur interne étant le témoin de bon fonctionnement de la réaction, il est influencé de façon identique au résultat par le mode opératoire, la qualité de la pratique opératoire, la qualité du lot de production, la nature de l'échantillon et ses caractéristiques, les conditions de lecture ainsi que les caractéristiques
20 de vision de l'opérateur ou du lecteur.

Dans une première version, le dispositif de test comprend un témoin de fonctionnement donnant une intensité A de coloration lors de la réalisation de l'analyse. Cette même intensité A observée pour la coloration du signal du résultat (signal obtenu dans la zone test) indique
25 que l'élément recherché est présent dans l'échantillon à un taux de $x \pm y$ ng/ml, ou encore indique que l'élément recherché est présent dans l'échantillon à un taux compris entre η et ρ ng/ml. Lorsque l'intensité du signal coloré du résultat est supérieure, on peut affirmer que l'élément recherché est présent dans l'échantillon à un taux supérieur à ρ ng/ml.
30 Lorsque l'intensité du signal coloré du résultat est inférieur, on peut affirmer que le taux dans l'échantillon de l'élément recherché est inférieur à η ng/ml.

Dans une seconde version, le dispositif de test comprend deux témoins de fonctionnement donnant deux intensités différentes ,A et B, de
35 coloration pour chaque témoin de fonctionnement lors de la réalisation

de l'analyse. Arbitrairement et pour la compréhension de cette version, l'intensité B est dite supérieure à l'intensité A.

Si la coloration du signal du résultat présente une intensité égale ou voisine de A, le taux dans l'échantillon de l'élément recherché est
5 compris entre χ et ϕ ng/ml.

Lorsque que le signal coloré du résultat présente une intensité voisine de B, le taux de l'élément recherché est compris entre 0 et θ ng/ml.

Lorsque le signal coloré du résultat présente une intensité inférieure à A, le taux de l'élément est inférieur à χ ng/ml.

10 Lorsque la coloration du signal résultat présente une intensité comprise entre les intensités A et B, le taux de l'élément recherché est compris entre ϕ et 0.

Lorsque le signal coloré du résultat présente une intensité supérieure à B, le taux de l'élément est supérieur à θ .

15 On a ainsi défini 5 plages de valeurs de résultats auxquelles correspondent des intensités de coloration du signal du résultat. Ce qui donne le tableau d'interprétation des résultats présenté dans la figure 1 de la planche 1.

Dans des versions dérivées de celle-ci, le nombre de témoins de
20 fonctionnement présentant des intensités de coloration du signal différentes peut être augmenté dans la mesure du souhaitable ou du nécessaire et dans les limites du possible tant dans la réalisation que dans la possibilité de lecture différentielle.

Dans une autre version applicable principalement aux tests utilisant
25 l'immunochromatographie latérale et dont la zone de résultat est en amont du ou des témoins de fonctionnement par rapport au sens de migration, le réactif de révélation n'est pas présent en large excès, mais en quantité juste suffisante pour donner une faible intensité de coloration du témoin de fonctionnement en présence de taux très élevés
30 de l'élément recherché dans l'échantillon, c'est à dire avec une intensité maximale de coloration du signal du résultat. Cette disposition entraîne un système de compétition pour le réactif de révélation entre les zones test et contrôle.

On aura alors une variation inverse des intensités de coloration des signaux de la ou des zones de résultat et des signaux du ou des témoins de fonctionnement.

Cette version a l'avantage d'augmenter la variation du rapport des intensités de coloration des signaux résultat(s)/témoin(s), ce qui conduit à une facilitation de la lecture et de l'interprétation des résultats.

En effet, en présence de faibles quantités d'élément recherché, l'intensité du signal du résultat sera faible et celui du témoin sera forte. Il sera alors d'autant plus visible et évident que l'intensité du résultat est inférieure au témoin.

En présence de quantités intermédiaires de l'élément recherché, les deux intensités seront identiques.

En présence de quantités élevées de l'élément, non seulement l'intensité du résultat sera élevée mais celle du témoin de fonctionnement sera diminuée d'autant.

Cette version a non seulement pour effet de faciliter la lecture comparative et donc l'interprétation, mais également de réduire l'étendue de la plage de valeurs où l'intensité des signaux résultat et témoin est identique.

Dans une dernière version qui peut d'ailleurs être couplée à l'une des versions précédentes, une substance non marquée et pour laquelle le réactif de capture du réactif de révélation qui est utilisé pour le témoin de fonctionnement présente une affinité, est incorporée au dispositif de test. On aura alors au niveau du témoin de fonctionnement, une réaction de compétition entre le réactif de révélation et cette substance non révélatrice. Ce qui permet de diminuer et fixer à une intensité voulue la coloration dudit témoin de fonctionnement.

La méthode préconisée pour obtenir un témoin de fonctionnement présentant une intensité de coloration déterminée lors de la réalisation de l'essai ou analyse est la suivante:

Tous les autres paramètres du test sont optimisés et fixés en fonction des caractéristiques souhaitées du test. En particulier, les paramètres concernant le réactif de révélation d'une part, et ceux concernant la zone test auront été définitivement établis auparavant, étant entendu que le réactif de révélation est en large excès.

Lors d'études antérieures et éventuellement par analyse des données scientifiques disponibles, on déterminera le ou les taux critiques de l'élément recherché, correspondant à un seuil d'interprétation de résultats quantitatifs.

- 5 On détermine alors l'intensité désirée en procédant au test avec une gamme d'échantillons présentant divers taux de l'élément recherché, dont le ou les taux critiques. Le ou les taux critiques vont alors donner une coloration du signal du résultat dont l'intensité sera appelée intensité de référence.
- 10 On déterminera ainsi la correspondance entre l'intensité de référence et une valeur ou plage de valeurs critiques et d'autre part on s'assurera que cette intensité est bien située dans un domaine de variation d'intensité du signal coloré du résultat en fonction du taux de l'élément recherché présent dans l'échantillon, c'est à dire que l'on observe bien une intensité
- 15 moindre pour un taux moindre et une intensité supérieure pour un taux supérieur.

- Les caractéristiques du dépôt de la zone de contrôle de fonctionnement seront alors déterminées par divers essais en faisant varier la concentration du ligand capturant le réactif de révélation, jusqu'à
- 20 l'obtention de l'intensité de référence. Ces essais seront conduits d'une part avec des échantillons contenant l'élément recherché au taux produisant l'intensité de référence pour la coloration du signal du résultat (zone test), ce qui permet la comparaison directe et d'autre part avec des échantillons négatifs ne contenant pas l'élément recherché et
- 25 des échantillons fortement positifs afin de s'assurer que le contrôle de fonctionnement est bien opérationnel dans tous les cas.

- Lorsque plusieurs témoins de fonctionnement sont souhaités, on procédera de même en ajustant les témoins de fonctionnement un par un, et en commençant par le témoin de fonctionnement devant présenter
- 30 la plus faible intensité de signal coloré, ou plus faible intensité de référence, et en le plaçant de préférence en amont du ou des autres témoins de fonctionnement dans le cas de test utilisant l'immunochromatographie latérale.

- Une seconde méthode est utilisable pour obtenir une intensité de
- 35 coloration déterminée du témoin de fonctionnement:

Au lieu et place, ou en complément, de la modification des caractéristiques de dépôt du ligand capturant le réactif de révélation, une substance non révélatrice et compétitive pour ce ligand est incorporé au dispositif. On détermine alors la quantité de cette substance
5 nécessaire pour obtenir l'intensité désirée de coloration du témoin de fonctionnement.

Voici un mode d'application de l'invention auxquels cette dernière ne se limite en aucune façon.

Exemple 1:

10 Cet exemple concerne un test rapide d'immunochromatographie latérale de détection des IgE totales dans du sérum humain, selon la méthode sandwich.

Le réactif de révélation est un anticorps spécifique des IgE humaines couplé avec de l'or colloïdal.

15 Dans la zone test (du résultat de l'analyse), est fixé un anticorps spécifique des IgE humaines.

Dans la zone de contrôle, témoin de fonctionnement, est fixé un anticorps présentant une affinité pour l'anticorps de révélation couplé à l'or colloïdal.

20 Concernant le taux des IgE totales dans le sérum, on peut distinguer les domaines de valeurs suivants:

Les valeurs inférieures à 100 kUI/l ne sont pas pathologiques.

Les valeurs comprises entre 100 et 400 kUI/l peuvent être ou non pathologiques.

25 Les valeurs comprises entre 400 et 1000 kUI/l sont pathologiques, indicatrices soit d'atopie, soit de pathologies en développement, soit de parasitoses.

Les valeurs supérieures à 1000 kUI/l sont pathologiques et indiquent une certaine gravité, soit d'allergie, soit d'autres pathologies.

30 L'intensité de coloration du résultat pour un taux d'IgE d'environ 700 kUI/l a donc été choisie comme intensité de référence. Il a été confirmé que des taux plus faibles (inférieurs à 400 kUI/l) et plus élevés (supérieurs à 1000 kUI/l) donnaient bien des intensités de coloration que l'on peut aisément distinguer de celle choisie comme référence.

Tous les autres paramètres du test ayant été auparavant définis, il a été procédé à divers dépôts avec diverses concentrations de l'anticorps présentant une affinité pour l'anticorps de révélation couplé à l'or colloïdal et qui est fixé dans la zone de contrôle. Il a été ainsi déterminé
5 la concentration de dépôt qui permettait d'obtenir une intensité de coloration du témoin de fonctionnement équivalente à celle obtenue pour le signal de résultat de détection d'IgE au taux de 700 kUI/l dans un échantillon de sérum.

On a ainsi obtenu un test dont l'interprétation des résultats est la
10 suivante:

- lorsqu'aucun signal n'est détecté dans la zone du résultat ou zone test, le taux d'IgE totales est inférieur à 100 kUI/l.
- lorsque le signal du résultat a une intensité de coloration inférieure à celle du témoin de fonctionnement, le taux d'IgE totales est compris
15 entre 100 et 400 kUI/l,
- lorsque le signal de résultat a une intensité voisine de celle du témoin de fonctionnement, le taux d'IgE est compris entre 400 et 1000 kUI/l,
- lorsque le signal de résultat a une intensité de coloration supérieure à celle du témoin, le taux d'IgE est supérieur à 1000 kUI/l,

20 Ce dispositif a pu être ainsi validé sur un échantillon de sérums tout venant, avec l'obtention d'une concordance satisfaisante entre l'interprétation des résultats (lecture) et les valeurs des taux d'IgE déterminées par une méthode quantitative reconnue.

Le dispositif de test de la présente invention est applicable à tout test
25 utilisant une réaction affine, comprenant un contrôle de fonctionnement interne, et caractérisé par la présence d'un réactif fixé sur un support, qui peut être de façon non limitative une membrane, et l'utilisation d'un réactif de révélation. Ce réactif de révélation peut comprendre des composants particuliers donnant une coloration ou des molécules
30 réactives, par exemple et de façon non limitative, des enzymes, dont la réaction permet d'obtenir une coloration, ou une absence de coloration, indicatrice de la nature du résultat.

L'élément recherché par ce dispositif de test peut-être de nature biologique, un anticorps ou un antigène, de nature chimique ou biochimique.

5 Ce dispositif de test et cette méthode est applicable à la détection de tout marqueur biologique d'une ou de plusieurs pathologies infectieuses, par exemple et de façon non exhaustive les tests de sérologie, et les tests de détection d'antigène.

10 Ce dispositif de test et cette méthode sont également applicables lorsque l'élément recherché est un seul type d'anticorps ou plusieurs types, classes ou sous-classes. Un exemple précis auquel les revendications du présent brevet ne se limite en aucune façon est la sérologie Chlamydia, et pour lequel ce dispositif et cette méthode permettent de déterminer ou d'évaluer le taux d'anticorps anti-chlamydia présent dans le sérum ou des échantillons d'autre nature de patients.

15 Ce dispositif de test et cette méthode sont également applicables lorsque l'élément recherché est un ou plusieurs antigènes spécifiques d'une ou de plusieurs pathologies.

Ce dispositif de test et cette méthode sont aussi applicables dans le cadre de suivi thérapeutique.

20 Ce dispositif de test peut être utiliser soit avec une lecture visuelle, effectuée par un opérateur humain, soit avec un appareil de lecture couplé ou non à un appareil de traitement de données.

25 La médiane de la plage de valeurs correspondant à l'intensité de coloration de référence indiquée par la coloration du témoin de fonctionnement est déterminée en fonction des caractéristiques désirées et nécessaires du test et des valeurs de l'élément recherché. Il en va de même lorsque plusieurs intensités de référence sont indiquées par plusieurs témoins de fonctionnement.

30 Par contre, lorsque la lecture est effectuée visuellement, l'étendue de la plage de valeurs correspondant à l'intensité de coloration de référence doit être déterminée expérimentalement et est dépendante de la nature du test, des réactifs le composants, en particulier le réactif de révélation, et des paramètres de production du test concerné. Cette remarque est bien sûr également valable pour chaque intensité de référence lorsqu'il y
35 en a plusieurs.

La lecture peut être également effectuée par une machine ou à l'aide d'un outil ou instrument. Cet appareil de lecture utilise alors l'intensité de coloration du signal du témoin de fonctionnement comme référence pour la lecture et l'interprétation du signal du résultat de la détection de l'élément ou des éléments recherchés. L'utilisation d'un tel instrument de lecture permet de limiter la correspondance de l'intensité de référence à une valeur précise et unique de l'élément recherché. De même, lorsque plusieurs intensités de référence sont indiquées par plusieurs témoins de fonctionnement, chaque intensité peut être mise en correspondance avec une seule valeur numérique de l'élément recherché.

On peut obtenir alors une interprétation beaucoup plus précise des résultats, en affectant à toute intensité, une valeur numérique unique.

Cette valeur peut être calculée selon la formule suivante: $V_e = V_r \times I_e / I_r$

V_e = Valeur de l'élément recherché dans l'échantillon

V_r = Valeur de l'élément recherché donnant l'intensité de référence I_r de coloration du signal du résultat.

I_r = Intensité de coloration de référence = Intensité de coloration du témoin de fonctionnement, lue lors de la réalisation de l'essai.

I_e = Intensité de coloration observée pour le signal du résultat.

De même, lorsque plusieurs témoins de fonctionnement indiquent plusieurs intensités de coloration de référence, il est possible de tracer une courbe étalon, permettant d'établir la correspondance entre toute intensité de coloration du signal de résultat observée et la valeur ou le taux de l'élément recherché.

Par exemple, dans le cas où deux témoins internes de fonctionnement donnent deux intensités de référence de coloration I_{r1} et I_{r2} , correspondant à deux valeurs V_{r1} et V_{r2} de l'élément recherché produisant chaque intensité correspondante pour la coloration du signal du résultat, on obtiendra la courbe étalon suivante permettant d'affecter une valeur V_e à une intensité observée I_e de coloration du signal du résultat. Un modèle de courbe étalon est décrit dans la figure 2 de la planche 1, dont voici la légende:

V_{r1} = Valeur de l'élément recherché donnant l'intensité de référence I_{r1} de coloration du signal du résultat.

Vr2 = Valeur de l'élément recherché donnant l'intensité de référence Ir2 de coloration du signal du résultat.

Ir1 = Intensité de coloration de référence N°1 = Intensité de coloration du témoin de fonctionnement N°1, lue lors de la réalisation de l'essai.

5 Ir2 = Intensité de coloration de référence N°2 = Intensité de coloration du témoin de fonctionnement N°2, lue lors de la réalisation de l'essai.

Ie = Intensité de coloration observée pour le signal du résultat.

Ve = Valeur de l'élément recherché dans l'échantillon

REVENDEICATIONS

1) Dispositif de test pour la quantification des résultats relatifs à la détection d'un élément et obtenus par une technique immunochromatographique dans laquelle la visualisation des résultats est associée à une coloration, caractérisé d'une part par le fait que le contrôle interne de fonctionnement des tests concernés donne une intensité définie de coloration du signal lors de la réalisation du test, et caractérisé d'autre part par le fait que l'intensité de coloration du signal obtenu avec ledit témoin interne ou contrôle interne de fonctionnement est utilisée pour évaluer par comparaison directe, visuellement ou à l'aide d'un appareil, l'intensité de coloration du signal obtenu lors de la détection de l'élément recherché.

2) Dispositif de test selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le contrôle interne de fonctionnement a été calibré et fabriqué de façon à donner une intensité déterminée de coloration du signal, inférieure à l'intensité maximale observable pour la coloration du signal du résultat, et permettant ainsi de définir trois domaines d'intensité de coloration du signal du résultat: inférieure, voisine, et supérieure à l'intensité de coloration du signal du témoin interne de fonctionnement.

3) Dispositif de test selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que l'intensité de coloration du signal du contrôle interne de fonctionnement est équivalente à l'intensité de coloration du signal du résultat obtenue pour une valeur connue ou plage de valeur connue de l'élément recherché, cette correspondance étant indiquée à l'utilisateur du dispositif.

4) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que plusieurs contrôles internes de fonctionnement sont calibrés pour donner différentes intensité de signal, et sont présents et utilisés pour définir différents domaines d'intensité de coloration de signal et ainsi quantifier le résultat du test.

5) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que la correspondance entre une ou des intensités de référence de coloration du signal du résultat et une ou des valeurs de l'élément recherché soit déterminée, indiquée, et utilisée pour l'interprétation des résultats, l'intensité ou les intensités de référence de

coloration étant celle(s) obtenue(s) pour un ou plusieurs témoin(s) interne(s) de fonctionnement.

5 6) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 où le réactif coloré comprend une substance particulière colorée qui peut être un complexe d'or colloïdal ou de sels de métaux ou des billes de latex.

10 7) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 où le réactif de révélation comprend une enzyme dont la réaction entraîne l'apparition d'une coloration, permettant la visualisation du résultat.

8) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par le fait qu'il comporte un appareil ou instrument de lecture, pouvant être couplé à un appareil de traitement des données.

15 9) Procédé permettant de fixer l'intensité de coloration du signal du témoin interne de fonctionnement à une intensité déterminée, correspondante à l'intensité de coloration du signal obtenue pour la détection de l'élément recherché à une valeur ou plage de valeurs dudit élément dans un échantillon.

20 10) Ensemble ou trousse d'analyse comprenant un dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, contenant un réactif de révélation réagissant avec un autre réactif dans le but d'indiquer le fonctionnement correct de l'analyse et donnant une intensité de coloration de signal utilisée en tant qu'élément de référence interne.

25

I: Intensité de coloration du signal du résultat	$I < A$	$I = A$	$A < I < B$	$I = B$	$I > B$
tx: taux de l'élément recherché	$tx < \chi$	$\chi < tx < \phi$	$\phi < tx < o$	$o < tx < \theta$	$tx > \theta$

Figure 1

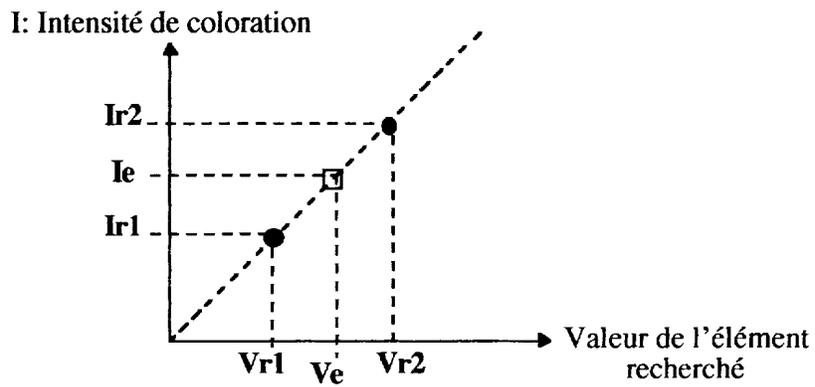


Figure 2

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 570239

FR 9900650

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 724 157 A (BAYER AG) 31 juillet 1996 (1996-07-31) * figure 3; exemple 2 *	1-10
X	EP 0 462 376 A (ABBOTT LAB) 27 décembre 1991 (1991-12-27) * exemple 1 *	1-10
X	WO 97 35205 A (SEREX INC) 25 septembre 1997 (1997-09-25) * page 35, ligne 14 - page 36, ligne 7; exemple 4 *	1-10
X	WO 97 09620 A (AGEN BIOMEDICAL LTD ; RYLATT DENNIS BRIAN (AU); MOSS DEAN (AU); JAN) 13 mars 1997 (1997-03-13) * revendications 1,4-6; figure 2; exemple 1 *	1-10
X	WO 98 32018 A (CARBURY HERNE LIMITED ; SLATER JAMES HOWARD (GB); REID ADAM G (GB);) 23 juillet 1998 (1998-07-23) * page 13, ligne 33 - page 14, ligne 18; figure 7 *	1-10
X	EP 0 303 110 A (BOEHRINGER BIOCHEMIA SRL) 15 février 1989 (1989-02-15) * revendication 1 *	1-10
A	WO 94 15215 A (MEDIX BIOCHEMICA AB OY ; KOUVONEN ILKKA SAKARI (FI); SVENS EIVOR HE) 7 juillet 1994 (1994-07-07) * figures 1A,2; exemple 1 *	1-10
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
18 octobre 1999		Hart-Davis, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)

G01N