



NUMERO DE PUBLICATION : 1004457A3

NUMERO DE DEPOT : 9100117

Classif. Internat.: G01N

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 24 Novembre 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 08 Février 1991 à 14h50
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : BIO-LINE S.A.
rue André Fauchille 17, 1150 BRUXELLES(BELGIQUE)

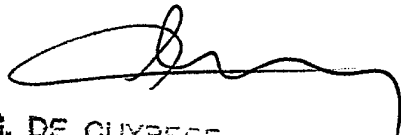
représenté(e)(s) par : VOSSWINKEL Philippe, BUREAU GEVERS S.A., Rue de Livourne 7 -
B 1050 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : TROUSSE DE DEPISTAGE D' ANTICORPS ANTINUCLÉAIRES ET PROCEDE DE DEPISTAGE DE TELS ANTICORPS.

INVENTEUR(S) : Smet Roger, Arsène, Joseph, Ghislain, rue Saint Roch 87, 5060 Falisolle (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 24 Novembre 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :


G. DE CUYPERE
Secrétaire d'administration

Trousse de dépistage d'anticorps antinucléaires
et procédé de dépistage de tels anticorps

5 La présente invention est relative à une trousse de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums, comprenant un support dans lequel sont disposés plusieurs puits présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins un antigène nucléaire, des réactifs appropriés pour réaliser un test ELISA ainsi qu'éventuellement un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif. Elle concerne également un procédé de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums.

10 Les anticorps antinucléaires sont, dans certaines circonstances, développés par l'organisme humain vis-à-vis d'antigènes nucléaires. On peut distinguer plusieurs antigènes nucléaires :

- 15 - les antigènes nucléaires chromosomiques : l'acide désoxyribonucléique natif ou double brin (ADNds), l'acide désoxyribonucléique dénaturé ou monobrin (ADNss), diverses histones (H1, H2a, H2b, H3, H4);
- les antigènes nucléaires extractibles (ENA), parmi lesquels on peut citer les antigènes Sm, RNP (ribonucléoprotéines), SSA, SSB, Scl-70, JO-1, RANA, PCNA, etc....

20 Les anticorps antinucléaires (ANA) réagissant à de l'ADNds sont présents dans 60 à 70 % des patients souffrant de lupus érythémateux disséminé (LED). Ces anticorps sont moins fréquemment détectés (< 5 %) chez des patients montrant d'autres types de pathologies autoimmunes, en particulier de l'arthrite juvénile

25 ou des troubles hépatiques. Cette spécificité des ANA est pratiquement toujours négative dans le cas de lupus induit par un médicament. Etant donné leur très haut degré de spécificité (95 %), les ANA réagissant à l'ADNds apparaissent parmi les critères essentiels du diagnostic du LED. La présence de ces anticorps peut servir soit

30 à confirmer le diagnostic du LED chez les patients où cette maladie est cliniquement suspectée, soit à détecter les patients asymptomatiques.

Des titres élevés en ANA anti-ADNds sont observés dans 60 à 70 % de LED actifs, spécialement avec complication rénale. Au contraire, de faibles titres indiquent plutôt des LED non actifs ou d'autres troubles.

5 Les anticorps antinucléaires réagissant à de l'ADNss sont relativement peu spécifiques; ils sont détectés dans la polyarthrite chronique évolutive (8 %), le syndrome primaire de Sjögren (13 %) et la sclérodermie (14 %). Les fréquences les plus élevées de test positif sont observées dans le LED (70 %), la polydermatomyosite (43 %) et le lupus érythémateux induit par un médicament (60 %).
10 Les anticorps contre l'ADNss sont parfois les seuls ANA positifs dans le cas de lupus cutané photosensible.

Les anticorps antinucléaires réagissant aux histones sont plus fréquents dans le LED (> 90 %) que dans d'autres types de connectivités (< 20 %) où ils sont présents à faibles titres. Le
15 lupus érythémateux induit ainsi que le lupus idiopathique ont une haute fréquence en ANA réagissant aux histones mais avec une spécificité différente pour les différentes classes d'histone. Les anticorps présents dans le LED réagissent à la fois au sous-groupe libre (H1)
20 des histones et aux sous-groupes complexés (H2a/H2b, H3/H4). Au contraire, les anticorps présents dans le lupus induit par le procaïnamide sont essentiellement dirigés contre le complexe H2a/H2b. Dans le lupus induit par de l'hydralazine, les anticorps montrent une spécificité seulement pour le complexe H3/H4.

25 Les ANA vis-à-vis des ENA sont trouvés dans un grand nombre de troubles rhumatismaux. Certains d'entre eux sont considérés comme des marqueurs diagnostiques (Sm, SSA, Jo-1, Scl-70).

Ainsi qu'il ressort de ce qui précède, il est souvent
30 important, pour poser un diagnostic, d'ajouter aux observations cliniques les résultats d'un test de dépistage permettant de déterminer la spécificité exacte des anticorps antinucléaires présents dans le sérum du patient examiné.

35 Plusieurs méthodes sont à l'heure actuelle appliquées pour détecter la présence d'anticorps antinucléaires dans des sérums.

On peut citer entre autres les essais par immunofluorescence indirecte ou les procédés d'immunoprécipitation comme la double immunodiffusion selon Ouchterlony (v. B.T. NGUYEN et A. MARKOVITS, ANA Atlas, Bruxelles, 1990, p. 14-30). On connaît également la technologie de transfert électrophorétique de protéines, dite de Western Blot. Enfin pour certains antigènes nucléaires, comme par exemple l'ADN, il est connu de pratiquer des techniques immunoenzymatiques, comme le test à immunosorbant lié à une enzyme (test ELISA).

Certaines de ces méthodes sont très coûteuses, certaines aussi peu sensibles. D'autres demandent beaucoup de temps. Enfin il est obligatoire d'appliquer plusieurs méthodes différentes devant être effectuées en succession. On doit compter généralement sur un délai de 72 h. pour une détermination précise des antigènes nucléaires concernés. D'une manière générale, afin que les examens soient rentabilisés on attend qu'il y ait environ 5 patients à tester. Il peut parfois être très long d'obtenir 5 patients pour lesquels on doive par exemple déterminer quels antigènes nucléaires extractibles sont présents dans leur organisme.

La présente invention a pour but d'éviter les inconvénients précités et de mettre au point une trousse de dépistage qui soit aisée à mettre en oeuvre et qui permette d'obtenir rapidement une détection sélective des anticorps antinucléaires recherchés. De préférence cette trousse sera d'un coût peu élevé et elle pourra être mise en oeuvre de manière rentable même s'il n'y a qu'un sérum de patient à tester. Cette trousse permettra avantageusement une plus grande sensibilité de test, notamment avec possibilité de détection des anticorps dès le début de la maladie.

On résout ces problèmes, suivant l'invention, par une trousse telle que décrite au début, dans laquelle le support comporte, par sérum à examiner, un groupe de puits, chaque groupe de puits comprenant plusieurs puits de dépistage prévus chacun pour réaliser un test ELISA, le revêtement du fond de chaque puits de dépistage d'un groupe de puits contenant un ou plusieurs antigènes nucléaires différents de celui ou ceux contenus dans le revêtement des autres puits de dépistage de ce groupe, et un puits de contrôle,

dont le fond est dépourvu de revêtement, pour un essai à blanc.

Suivant une forme de réalisation de l'invention, le support comporte au moins une barrette dans chacune desquelles les puits d'un groupe de puits sont disposés l'un derrière l'autre.

5 On connaît des barrettes qui sont rangées sur un support et dans lesquelles sont disposés l'un derrière l'autre des puits prévus pour réaliser des tests ELISA. De telles barrettes sont par exemple mises sur le marché par la firme Nunc A/S, Roskilde, Danemark, sous la dénomination de Nunc-Immuno-Module. Dans les trousse de dépistage

10 connues, les fonds des puits d'une barrette sont tous recouverts d'un revêtement contenant un ou plusieurs antigènes identiques. Chaque puits d'une barrette est donc destiné à recevoir le sérum d'un patient différent et, pour des raisons de rentabilité, on doit alors attendre qu'il y ait suffisamment de patients à examiner, cinq

15 par exemple, pour entamer l'essai. Selon la présente invention, par contre, les fonds de chacun des puits de dépistage d'une barrette sont recouverts d'un revêtement contenant un ou des antigènes différents et tous les puits de dépistage d'une barrette sont destinés à recevoir le sérum du même patient. Il en résulte la possibilité d'entamer

20 immédiatement l'examen, lequel peut être terminé 2 heures plus tard.

Suivant une forme de réalisation avantageuse de l'invention, chaque groupe de puits comprend au moins trois puits de dépistage, le revêtement d'un premier puits de dépistage contenant

25 au moins un acide désoxyribonucléique (ADN), le revêtement d'un deuxième puits de dépistage contenant au moins un antigène nucléaire extractible et le revêtement d'un troisième puits de dépistage contenant au moins une histone. Le revêtement du premier puits peut avantageusement contenir de l'ADNs et le revêtement d'un puits de dépistage supplé-

30 mentaire peut alors contenir de l'ADNss.

Suivant une autre forme de réalisation de l'invention, chaque groupe de puits comprend plusieurs puits de dépistage présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins une histone et le revêtement du fond de chacun de ceux-ci contient une ou plusieurs

35 histones différentes de celle ou celles contenues dans les autres

puits de dépistage contenant au moins une histone. Par exemple le revêtement d'un puits contiendra au moins une histone H1 riche en lysine tandis que le revêtement d'un autre puits contiendra un mélange d'histones H2a, H2b, H3 et H4.

5 Suivant une forme particulière de réalisation de l'invention, chaque groupe de puits comprend plusieurs puits de dépistage présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins un antigène nucléaire extractible et le revêtement du fond de chacun de ceux-ci contient un ou plusieurs antigènes nucléaires extractibles
10 différents de celui ou ceux contenus dans les autres puits de dépistage contenant au moins un antigène nucléaire extractible.

 Suivant une forme préférée de réalisation de l'invention, la trousse comprend en outre un puits témoin pour le sérum témoin positif, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant un mélange des antigènes contenus dans les revêtements d'au moins deux puits de dépistage distincts d'un groupe de puits, et le sérum témoin positif est un mélange de sérums positifs vis-à-vis des antigènes de ce mélange d'antigènes. Avantageusement,
15 la trousse comprend aussi un puits témoin pour le sérum témoin négatif, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant ledit mélange d'antigènes et le sérum témoin négatif est un sérum ou un mélange de sérums qui est négatif vis-à-vis de tous les antigènes dudit mélange. La trousse peut éventuellement
20 contenir un puits témoin pour le sérum à examiner, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant ledit mélange. De préférence, ledit mélange d'antigènes contient tous les antigènes présents dans les puits de dépistage, de préférence en parts égales.

 Il est avantageux de prévoir dans la trousse suivant l'invention, comme réactif, une immunoglobuline IgG anti-humaine de type (H + L). Cette immunoglobuline anti-humaine permet de
30 détecter la présence dans le sérum aussi bien d'immunoglobuline IgM que IgG, c'est-à-dire qu'une détection très précoce de l'apparition des anticorps antinucléaires devient possible. Cela n'est pas réalisable, selon l'état de la technique.

35 La trousse de dépistage suivant l'invention peut

comprendre en outre un tableau d'interprétation des densités optiques obtenues dans chaque puits d'un groupe à la fin du test ELISA, ce tableau d'interprétation présentant des valeurs maximales de sérum négatif et des valeurs minimales de sérum positif pour chacun des puits de dépistage, les valeurs ayant été établies en fonction des résultats obtenus sur une grande série de sérums positifs et négatifs, ainsi qu'éventuellement des valeurs de témoin positif et de témoin négatif établies en fonction des sérums positif et négatif contenus dans la trousse utilisée.

L'invention a également pour objet un procédé de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums, qui permette en une seule opération la détection sélective de ces anticorps et cela en un temps minimal et avec une sécurité poussée du résultat.

Pour résoudre ce problème on a prévu suivant l'invention un procédé de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums comprenant, pour chaque sérum, plusieurs dépistages par test ELISA, effectués simultanément, chacun des dépistages simultanés permettant de détecter de manière sélective la présence dans le sérum examiné d'un ou de plusieurs anticorps antinucléaires qui sont différents de celui ou de ceux détectables dans les autres dépistages simultanés, un essai à blanc, une lecture simultanée des densités optiques des dépistages et de l'essai à blanc et, sur base de résultats de ladite lecture, une détermination de l'absence d'anticorps antinucléaires ou de la présence d'un ou de plusieurs des anticorps antinucléaires recherchés. L'invention offre donc l'avantage d'effectuer un test ELISA simultanément sur plusieurs échantillons du sérum d'un même patient. Cet examen peut avantageusement être précédé d'une détection d'anticorps antinucléaires courante par immunofluorescence indirecte, ce qui permet d'éliminer déjà certains sérums, par exemple ceux contenant des anti-centromères.

L'invention va être décrite de manière plus détaillée dans la suite, à l'aide d'un exemple de réalisation non limitatif.

On prévoit une trousse de dépistage comprenant un cadre supportant plusieurs barrettes, par exemple du type mis sur le marché sous la dénomination de Nunc-Immuno-Module. Chaque

barrette comporte 8 puits : cinq puits de dépistage, deux puits témoins et un puits de contrôle.

On met au point les puits de dépistage de la manière suivante. En premier lieu, on prépare cinq solutions d'antigènes anti-nucléaires :

5

Solution 1 : histones autres que H1 (Sigma N 7755). On conserve, comme solution mère, 10mg de Sigma N 7755 dans 10 ml de tampon carbonate (3,18g de Na_2CO_3 , 5,86g de NaHCO_3 , 0,20 g de NaN_3 et H_2O distillée en quantité suffisante pour 1 litre), à une température de -20°C . Pour l'emploi, on dilue à 1/10 dans du tampon carbonate.

10

Solution 2 : histones H1 (Sigma H 5880).

Comme solution mère, on conserve à -20°C 2mg de Sigma H 5880 dans 1 ml de tampon carbonate. Pour l'emploi, on dilue à 1/10 dans ce même tampon.

15

Solution 3 : ADNds (Sigma D 3636 - sel de sodium de thymus de veau de type II, hautement polymérisé).

Comme solution mère, on conserve 10 mg de ce produit dans 1 ml de tampon carbonate. Pour l'emploi, on dilue à 1/10 dans ce même tampon.

20

Solution 4 : ADNss.

On chauffe 1 ml de la solution mère de la solution 3 à 100°C au bain-marie, pendant 10 minutes, et on la refroidit dans un bain de glace. Cette solution contient alors de l'ADN dénaturé monobrin. On la dilue à 1/20 dans le tampon carbonate, pour l'emploi.

25

Solution 5 : Antigènes nucléaires extractibles.

On mélange deux extraits contenant de tels antigènes : de l'extrait de thymus de veau (CTE) et de l'extrait de rate de primate (PSE), et on dilue 50 fois, dans du tampon carbonate, après reconstitution des extraits lyophilisés, selon les recommandations du fabricant (par exemple la firme Mardx Diagnostics Inc., Scotch Plains, New Jersey, Etats-Unis d'Amérique).

30

Ces solutions sont employées pour la sensibilisation des puits de dépistage des barrettes d'une trousse suivant l'invention. On distribue 100 μl des différentes solutions 1 à 5 dans leurs puits

35

correspondants et on couvre ceux-ci. On laisse alors incuber pendant 3 h à une température comprise entre 0°C et 40°C, de préférence entre la température ambiante et 40°C, et avantageusement à 37°C. On évacue les résidus de solution, hors des puits, par exemple par aspiration ou centrifugation.

5

On distribue alors dans les puits 125 µl de tampon carbonate additionné de 1% d'albumine bovine, et on couvre les puits. On laisse à nouveau incuber pendant 1 heure à une température comprise entre 0°C et 40°C, de préférence de 37°C. On lave à quatre reprises avec un tampon PBS Tween à 0,05 % (76,5 g de NaCl, 9,025 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O, 2,1 g de KH₂PO₄, H₂O distillée en quantité suffisante pour obtenir 10 l, 0,05 % de Tween 20 FLUKA), qui est additionné de 1 % d'albumine bovine.

10

On distribue ensuite dans les puits 125 µl d'un réactif fixateur à base de tampon PBS Tween à 0,05 %, additionné de 10 % de glycérol. On attend environ 15 minutes et on élimine les résidus liquides, par exemple par aspiration ou centrifugation.

15

On sèche ensuite pendant 1 h à 37°C, on couvre les puits et on les conserve à 4°C, ou de préférence à -20°C. Les barrettes sont à présent sensibilisées et prêtes à l'emploi.

20

Pour la préparation des deux puits témoins on a mélangé les solutions 1 à 5, mentionnées précédemment, en parts égales et c'est ce mélange qui est distribué dans ces deux puits au début de la sensibilisation des puits des barrettes. Le processus de sensibilisation est poursuivi de la même manière que celle décrite ci-dessus pour les puits de dépistage, et simultanément à celui-ci.

25

Le dépistage peut s'effectuer dès que le sérum d'un seul patient doit être examiné.

On lave les puits à 4 reprises, avant l'emploi, avec une solution de lavage formée du tampon PBS Tween à 0,05 %. On dilue le sérum à examiner à 1/100 dans ce même tampon, additionné de 1% d'albumine bovine. On distribue 100 µl dans les puits de dépistage et le puits de contrôle. On procède de même avec les sérums positif et négatif dans les puits témoins, mais en distribuant là le sérum positif et le sérum négatif. On laisse alors incuber pendant 30 minutes à 37°C.

35

Après un lavage à 4 reprises avec la solution de lavage, on distribue dans tous les puits 100 µl d'un anticorps anti-humain, par exemple de l'anti-immunoglobuline IgG humaine, de préférence de type H + L (par exemple celle produite par la firme
5 SERA-LAB Ltd, Sussex, Grande-Bretagne, sous le code : SDL-2515), cet anticorps anti-humain étant conjugué à une enzyme, notamment de la phosphatase alcaline (à la dilution de 1/200 dans le tampon PBS Tween à 0,05 %, additionné de 1% d'albumine bovine). On laisse
10 incuber, par exemple pendant 60 minutes à 37°C.

Après un lavage à 4 reprises avec la solution de lavage, on distribue dans les puits 100 µl d'un substrat pour l'enzyme, par exemple du phosphate de paranitrophényle, qui a été dilué dans un tampon de substrat, par exemple de la diéthanolamine. On couvre
15 ensuite les puits, et on laisse incuber à l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C.

On bloque alors la réaction par 50 µl de NaOH 3N. L'absorbance des échantillons peut ensuite être lue sur un lecteur de plaque de microtitrage courant, à 405 nm.

Lors de cette lecture, de la valeur de densité optique observée dans les puits de dépistage doit être soustraite la valeur observée dans le puits de contrôle. Dans la trousse de cet exemple, la densité optique observée pour le témoin négatif doit avantagement
20 être inférieure à 0,317 et celle pour le témoin positif supérieure à 1,246. Comme il est compliqué d'obtenir un sérum positif standard et un sérum négatif standard, étant donné qu'il s'agit de mélanges
25 de plusieurs sérums devant être réactifs ou non à plusieurs antigènes à la fois, il est préférable qu'un tableau d'interprétation des résultats tel que donné ci-dessous à titre d'exemple accompagne chaque trousse, avec des valeurs correspondant aux sérums témoins réellement présents
30 dans la trousse.

TABLEAU
Résultat

Antigène nucléaire	Négatif	Douteux	Positif
ADN ds	< 0,200	0,200 - 0,300	> 0,300
ADN ss	< 0,300	0,300 - 0,500	> 0,500
H1	< 0,350	0,350 - 0,500	> 0,500
H2a, H2b, H3, H4	< 0,150	0,150 - 0,250	> 0,250
ENA	< 0,250	0,250 - 0,400	> 0,400

10 Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée à la forme de réalisation décrite ci-dessus et que bien des modifications pourraient y être apportées sans sortir de son cadre.

15 On pourrait par exemple prévoir des trousse où chaque barrette contient un nombre de puits supérieur à 8. Cela permettrait une détection sélective plus poussée, notamment des antigènes nucléaires extractibles.

20 On pourrait aussi imaginer que, dans certains cas, le test tel que décrit ci-dessus avec 5 puits de dépistage ne soit pas suffisant pour dépister l'anticorps présent. C'est le cas notamment de troubles rhumatismaux induits par certains ENA. On peut alors prévoir une seconde trousse semblable à la première, mais dans laquelle les cinq puits de dépistage contiennent cette fois chacun un ou plusieurs ENA différents de celui ou de ceux contenus dans
25 les autres puits. Après le premier dépistage (durée d'environ 2 heures), on effectue immédiatement le second de même durée et un diagnostic très sensible peut être posé en un temps très court par rapport à ce qui existe dans la pratique.

30 Il est évident que les tests ELISA sont connus en soi et que divers réactifs équivalents à ceux décrits ci-dessus peuvent être utilisés dans ce but.

On pourrait aussi prévoir de ne pas avoir de puits témoins, ou uniquement un puits témoin pour le sérum positif ou pour le sérum négatif.

35 On pourrait par ailleurs prévoir un puits témoin,

non plus pour un sérum positif ou négatif, mais pour le sérum à examiner. Un tel puits témoin recouvert d'un revêtement contenant avantageusement tous les antigènes prévus dans les puits de dépistage permettrait un contrôle comparatif. Si le sérum à examiner est négatif, il doit l'être également dans le puits témoin. S'il est positif pour un des puits de dépistage, il doit également l'être dans le puits témoin. La présence de cette concordance permet de vérifier la validité du test.

REVENDEICATIONS

1. Trousse de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums, comprenant

5 un support dans lequel sont disposés plusieurs puits présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins un antigène nucléaire,

des réactifs appropriés pour réaliser un test ELISA, ainsi qu'éventuellement un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif,

10 caractérisée en ce que le support comporte un groupe de puits par sérum à examiner, et en ce que chaque groupe de puits comprend

15 plusieurs puits de dépistage prévus chacun pour réaliser un test ELISA, le revêtement du fond de chaque puits de dépistage d'un groupe de puits contenant un ou plusieurs antigènes nucléaires différents de celui ou ceux contenus dans le revêtement des autres puits de dépistage de ce groupe, et

un puits de contrôle, dont le fond est dépourvu de revêtement, pour un essai à blanc.

20 2. Trousse de dépistage suivant la revendication 1, caractérisée en ce que le support comporte au moins une barrette dans chacune desquelles les puits d'un groupe de puits sont disposés l'un derrière l'autre.

25 3. Trousse de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que chaque groupe de puits comprend au moins trois puits de dépistage, le revêtement d'un premier puits de dépistage contenant au moins un acide désoxyribonucléique (ADN), le revêtement d'un deuxième puits de dépistage contenant au moins un antigène nucléaire extractible et le revêtement

30 d'un troisième puits de dépistage contenant au moins une histone.
4. Trousse de dépistage suivant la revendication 3, caractérisée en ce que le revêtement du premier puits de dépistage contient de l'acide désoxyribonucléique natif ou double brin (ADNs) et en ce qu'un puits de dépistage supplémentaire contient de l'acide

35 désoxyribonucléique dénaturé ou monobrin (ADNss).

5. Trousse de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que chaque groupe de puits comprend plusieurs puits de dépistage présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins une histone et en ce que le revêtement du fond de chacun de ceux-ci contient une ou plusieurs histones différentes de celle ou celles contenues dans les autres puits de dépistage contenant au moins une histone.

6. Trousse de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que chaque groupe de puits comprend plusieurs puits de dépistage présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant au moins un antigène nucléaire extractible et en ce que le revêtement du fond de chacun de ceux-ci contient un ou plusieurs antigènes nucléaires extractibles différents de celui ou ceux contenus dans les autres puits de dépistage contenant au moins un antigène nucléaire extractible.

7. Trousse de dépistage suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un puits témoin pour le sérum témoin positif, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant un mélange des antigènes contenus dans les revêtements d'au moins deux puits de dépistage distincts d'un groupe de puits, et en ce que le sérum témoin positif est un mélange de sérums positifs vis-à-vis des antigènes de ce mélange d'antigènes.

8. Trousse de dépistage suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un puits témoin pour le sérum témoin négatif, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant un mélange des antigènes contenus dans les revêtements d'au moins deux puits distincts d'un groupe de puits et en ce que le sérum témoin négatif est un sérum ou un mélange de sérums qui est négatif vis-à-vis de tous les antigènes dudit mélange.

9. Trousse de dépistage suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un puits témoin pour le sérum à examiner, ce puits témoin présentant un fond recouvert d'un revêtement contenant un mélange

des antigènes contenues dans les revêtements d'au moins deux puits distincts d'un groupe de puits.

5 10. Trousse de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que ledit mélange d'antigènes contient tous les antigènes présents dans les puits de dépistage, de préférence en parts égales.

10 11. Trousse de dépistage suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme réactifs, un produit de conjugaison d'une immunoglobuline IgG anti-humaine et de phosphatase alcaline ainsi que du phosphate de paranitrophényle.

12. Trousse de dépistage suivant la revendication 11, caractérisée en ce que le produit de conjugaison comprend une immunoglobuline IgG anti-humaine de type (H + L).

15 13. Trousse de dépistage suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un tableau d'interprétation des densités optiques obtenues dans chaque puits d'un groupe à la fin du test ELISA, ce tableau d'interprétation présentant des valeurs maximales de sérum négatif
20 pour chacun des puits de dépistage et des valeurs minimales de sérum positif pour chacun d'eux, ces valeurs ayant été établies en fonction des résultats obtenus sur une grande série de sérums positifs et négatifs, ainsi qu'éventuellement des valeurs de témoin positif et de témoin négatif établies en fonction des sérums positif et négatif
25 contenus dans la trousse utilisée.

14. Procédé de dépistage d'anticorps antinucléaires dans des sérums comprenant, pour chaque sérum,

plusieurs dépistages par test ELISA, effectués simultanément,

30 chacun des dépistages simultanés permettant de détecter de manière sélective la présence dans le sérum examiné d'un ou de plusieurs anticorps antinucléaires qui sont différents de celui ou de ceux détectables dans les autres dépistages simultanés,
un essai à blanc,
35 une lecture simultanée des densités optiques des

dépistages et de l'essai à blanc et,

sur base de résultats de ladite lecture, une détermination de l'absence d'anticorps antinucléaires ou de la présence d'un ou de plusieurs des anticorps antinucléaires recherchés.

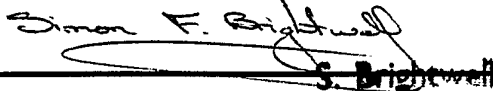
5 15. Procédé de dépistage suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend simultanément, pour chaque sérum, au moins un dépistage d'acide désoxyribonucléique, au moins un dépistage d'histone et au moins un dépistage d'antigène nucléaire extractible.

10 16. Procédé de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 14 et 15, caractérisé en ce qu'il comprend, avant lesdits dépistages, une détection d'anticorps antinucléaires par immunofluorescence indirecte.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Rapport de recherche de type international
 établi en vertu de l'article 21 § 9
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		RÉFÉRENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE 4OPRI/YS/610	
Demande nationale belge n° 9100117		Date du dépôt 8 février 1991	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (nom) BIO-LINE S.A.			
Date de requête de la recherche de type international 18 avril 1991		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale. SN 17877 BE	
I, CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification , les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.Cl. ⁵ : G 01 N 33/53, G 01 N 33/564, G 01 N 33/543			
II, DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification	Symboles de la classification		
Int.Cl. ⁵	G 01 N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III, <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV, <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

V. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENT ¹⁰		
Catégorie °	Citation du document, ¹² avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0206779 (MODERN DIAGNOSTIC INC.) 30 décembre 1985, voir page 1, ligne 32 - page 2, ligne 23; page 3, lignes 17-23; page 10, lignes 7-13 ---	1-16
Y	WO,A,8809932 (AMRAD CORP.) 15 décembre 1988, voir page 14, lignes 1-26 ---	1-16
Y	ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 32, no. 4, avril 1989, (US), J.L. SUBIZA et al.: "DNA-anti-DNA complexes account for part of the antihistone activity found in patients with systemic lupus erythematosus", pages 406-412, voir colonne 1, ligne 17 - colonne 2, ligne 32 ---	1-16
A	WO,A,8000026 (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORP.) 10 janvier 1980, voir le document en entier -----	1-16
<p>° Catégories spéciales de documents cités : ¹⁵</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique non considéré comme particulièrement pertinent.</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date.</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée).</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens.</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieur à la date de priorité revendiquée.</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt internationale ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention.</p> <p>"X" document particulièrement pertinent : l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive.</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents le même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets.</p>		
VI. CERTIFICATION		
Date d'achèvement effectif de la recherche de type international ² 30-09-1991		Date d'expédition du rapport de recherche de type international ²
Administration chargée de la recherche internationale ¹ OFFICE EUROPEEN DES BREVETS Département de la Haye		Signature d'un fonctionnaire autorisé ¹⁶  S. Brightwell

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL
RELATIF A LA DEMANDE NO.**

BE 9100117

SN 17877

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

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 15/10/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni celle de l'Office Belge de la propriété industrielle.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0206779	30-12-86	JP-A- 62032363	12-02-87
WO-A- 8809932	15-12-88	AU-A- 1944088 EP-A- 0363388	04-01-89 18-04-90
WO-A- 8000026	10-01-80	US-A- 4234563 CA-A- 1117008 CA-A- 1128417 EP-A, B 0019620 JP-A- 54158996	18-11-80 26-01-82 27-07-82 10-12-80 15-12-79

EPO FORM P0431

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82