RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 459 480**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 80 13626**

(54) **Tests et réactifs de diagnostic par agglutination et procédés pour préparer ces réactifs.**

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

(22) Date de dépôt..... 19 juin 1980.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA, 19 juin 1979, n° 50 269.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 2 du 9-1-1981.

(71) Déposant : SIBER George R., résidant aux EUA.

(72) Invention de : George R. Siber.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

Tests et réactifs de diagnostic par agglutination et procédés pour préparer ces réactifs.

La présente invention concerne des tests et des réactifs de diagnostic par agglutination ; plus particulièrement l'invention concerne des tests directs d'agglutination de particules visant à déterminer la présence ou l'absence d'antigènes dans des liquides de l'organisme tels que le sérum, l'urine, le liquide céphalorachidien et similaires pour contribuer au diagnostic de certains états physiologiques ou pathologiques chez l'homme et l'animal.

La détection d'antigènes microbiens dans les liquides de l'organisme peut être utile pour le diagnostic rapide d'un nombre croissant d'infections. Cependant un problème important est que les techniques actuelles ne sont pas suffisamment sensibles (immunodiffusion, immuno-électrophorèse à contre-courant), si bien que l'on ne peut pas mettre en évidence la présence d'antigènes chez une proportion importante de patients infectés, ou sont trop lentes pour permettre le diagnostic rapide (détermination radio-immunologique, essai avec immunoabsorbant) lié à une enzyme. Dans certains cas, le complexe antigène-anticorps se forme lentement et/ou les particules formées sont trop petites pour être observées de façon certaine. Pour améliorer les possibilités de détection, on a utilisé des tests d'agglutination employant des particules servant de supports sur la surface desquelles la molécule d'antigène ou d'anticorps est adsorbée ou fixée.

On peut effectuer ces tests d'agglutination selon une technique indirecte dans laquelle on mélange l'échantillon clinique à l'anticorps avec une dilution déterminée et, après une période d'incubation appropriée, on ajoute au mélange un système indicateur constitué d'un complexe fait de l'antigène fixé à un support particulaire. Si l'antigène est présent dans l'échantillon clinique, l'anticorps n'est pas disponible pour réagir avec le complexe antigène-support et il ne se produit pas d'agglutination, cette absence d'agglutination

constituant un test positif de l'antigène. Inversement, si l'antigène est absent de l'échantillon clinique, l'anticorps réagit avec le complexe antigène-support ce qui provoque une agglutination de l'échantillon indicateur. La théorie sur laquelle repose ces tests d'agglutination est bien connue dans l'art comme illustré par les brevets US n° 3 171 783, n° 3 775 536, n° 3 873 683, n° 3 879 262, n° 4 003 988 et n° 4 045 384.

On considère depuis longtemps que la seule voie vraiment significative pour le diagnostic des maladies infectieuses est la détection précoce et rapide des antigènes associés à l'agent infectieux pour permettre l'application immédiate d'un traitement efficace.

L'invention concerne un test direct d'agglutination pour la détection des antigènes.

Plus particulièrement l'invention concerne un test d'agglutination très sensible pour la détection des antigènes, tels que les protéines et les polysaccharides de divers micro-organismes y compris les bactéries, les protozoaires et les champignons à de faibles concentrations dans les liquides de l'organisme. Un test selon l'invention permet la détection selon une technique simple d'une concentration aussi faible que 0,2 ng/ml des polysaccharides capsulaires associés aux bactéries pathogènes. Ceci correspond à une sensibilité 25 à 250 fois supérieure à celle des méthodes d'immuno-électrophorèse à contre-courant très utilisées et à une sensibilité au moins égale à celle des déterminations radio-immunologiques. De plus bien que l'immuno-électrophorèse à contre-courant soit rapide, elle nécessite un personnel de laboratoire expérimenté ainsi que des réactifs et un appareillage assez coûteux et sa sensibilité vis-à-vis de la plupart des polysaccharides bactériens est limitée entre 10 et 50 ng/ml. Comme des concentrations plus faibles en antigènes sont fréquentes dans les liquides de l'organisme, l'immuno-électrophorèse à contre-courant donne souvent des résultats faussement négatifs chez des patients atteints d'une infection bactérienne confirmée par culture. D'autre part, la détermination

radio-immunologique est 10 à 100 fois plus sensible que l'immuno-électrophorèse à contre-courant mais elle est bien plus lente et coûteuse.

Avant l'invention, la généralisation de l'emploi des tests d'agglutination des particules, bien qu'ils soient extrêmement simples et peu coûteux, était limitée par le faible degré de sensibilité à de faibles concentrations de l'antigène et à la mauvaise spécificité se traduisant par des agglutinations non spécifiques en particulier avec les échantillons de sérum. Lorsqu'on opère selon la technologie de l'invention décrite ci-après, on atteint une sensibilité de l'ordre de 0,2 ng/ml et la fréquence des agglutinations non spécifiques avec les sérums humains est réduite à 2% ou moins. De plus, le choix judicieux et la préparation de l' l'antisérum permettent d'effectuer un test caractérisé par une sensibilité uniforme, une bonne stabilité et une bonne spécificité.

L'invention a pour but de fournir un test d'agglutination sensible des particules pour la détection d'antigènes microbiens dans les liquides de l'organisme à des concentrations aussi faibles que 0,2 ng/ml de liquide de l'organisme.

Elle a également pour but de fournir un test d'agglutination des particules caractérisé par une fréquence d'agglutination non spécifique avec les sérums humains de 2% ou moins ; elle vise en particulier une détermination améliorée par agglutination de particules pour la détection rapide du polyribophosphate (PRP) du polysaccharide capsulaire d'Haemophilus influenzae type b, (H.i.b).

La sensibilité limitée est le problème principal des procédés précédemment décrits de détection des antigènes microbiens. Par conséquent, on ne peut pas détecter un antigène microbien chez tous les patients atteints d'infections confirmées. Par exemple des tests ont montré que chez 7 à 22% de patients atteints de méningite à H.i.b., 38% de patients atteints d'épiglottite à H.i.b., 20 à 39% de patients atteints de pneumonie pneumococcique avec bactériémie

et 50 à 90% de patients atteints de pneumonie pneumococcique sans bactériémie, on ne pouvait pas détecter d'antigène dans le sérum ou le liquide céphalorachidien selon les tests connus par immuno-électrophorèse à contre-courant ou par agglutination de particules. Cependant une détermination radio-immunologique qui est capable de détecter 0,5 ng/ml ou moins permet de diagnostiquer pratiquement tous les cas de méningites à H.i.b. dès le premier examen par un médecin. Les résultats des tests indiquent également que la concentration de l'antigène chez 37% des patients est inférieure à 10 ng/ml et que par conséquent elle est inférieure à la sensibilité de la plupart des techniques d'immuno-électrophorèse à contre-courant dont on dispose.

L'invention concerne un test d'agglutination des particules ayant un degré de sensibilité comparable à celui des déterminations radio-immunologiques. Le degré élevé de sensibilité du test de l'invention résulte de modifications des tests connus d'agglutination des particules à savoir le choix d'un antisérum anti-H.i.b. spécifique, l'emploi d'une fraction de globulines de cet antisérum, le lavage des particules sensibilisées et la prolongation de la période d'incubation des tests d'agglutination des particules de la valeur habituelle de 5 minutes à environ 45 minutes ou plus.

a. Sensibilité.

Le choix de l'antisérum a un effet important sur la sensibilité du test. Six antisérums préparés chez trois espèces animales permettent d'obtenir des particules ayant des sensibilités comprises entre 0,2 ng et plus de 1 000 ng de PRP/ml. La qualité fonctionnelle de l'anticorps spécifique ainsi que sa concentration sont importantes. L'antisérum produisant les particules les plus sensibles n'a pas la concentration maximale en anticorps mesurée par radio-détermination de la fixation d'antigène.

On prépare six antisérums dirigés contre Haemophilus influenzae type b total chez quatre lapins, un âne et un cheval selon les programmes d'immunisation décrits par H.E. Alexander et coll. dans Journal of Immunology 54 :

207-211, 1946.

Dans l'invention, on entend par "particules" des particules inertes et neutres vis-à-vis des autres composants et capables d'adsorber les antisérums de façon irréversible. Ces particules peuvent être des perles de verre ou des particules de polybutadiène, de polystyrène, de polybutadiène-styrène, etc. ayant une taille moyenne d'environ 0,15 à environ 0,9 µm. De préférence on sensibilise des particules de latex de polystyrène ayant un diamètre uniforme d'environ 0,81 µm sous forme d'une suspension à 10% p/v dans de l'eau distillée avec les antisérums précités de la façon suivante :

On dilue les antisérums entiers d'âne et de lapins à 1/500 et on dilue l'antisérum entier de cheval au 1/200 dans du tampon salé standard à la glycine (0,1 M en glycine, 0,9 % de chlorure de sodium, pH 8,2). Pour adsorber les anticorps sur les particules de latex, on ajoute 1 partie de suspension de latex à 10% à 80 parties d'antisérum dilué et on incube à la température ordinaire pendant une heure. On décante les antisérums libres après centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 x g. On met le culot de latex en suspension dans du tampon salé à la glycine avec une petite quantité de protéine, telle que 0,1 % de sérum-albumine humaine ou 0,1% de sérum d'âne, de lapin ou de cheval selon le cas, pour obtenir une suspension à 0,125% de latex, on centrifuge à nouveau et on remet en suspension dans du tampon salé à la glycine. On utilise du sérum foetal de veau, ne contenant pas d'anticorps anti-PRP, par détermination radio-immunologique, comme diluant pour les solutions standards d'antigène PRP.

Pour effectuer l'agglutination, on ajoute des portions de 0,05 ml de liquide contenant l'antigène à des fractions de 0,01 ml de solution de latex sensibilisé sur une lame pour examen sérologique comportant des anneaux en céramique. On fait tourner la lame (180 tr/min) dans une chambre humidifiée à la température ordinaire et on examine l'agglutination après 45 minutes. On note l'agglutination 4^+ lorsque le mélange d'agglutination est limpide et qu'on

observe des amas grossiers de particules de latex, 3^+ lorsque le mélange demeure trouble mais qu'on observe des amas grossiers, 2^+ lorsque le mélange demeure trouble et granuleux et 1^+ lorsque le mélange demeure trouble mais n'est que très peu granuleux. On considère qu'une agglutination égale ou supérieure à 2^+ est positive. Les sensibilités comparées figurent dans le tableau 1.

Tableau 1

Sensibilité de la détermination par agglutination de particules de latex avec six antisérums anti-Haemophilus influenza type b.

Sérum	Anticorps anti-PRP du sérum total [1] (µg de protéines d'anticorps/ml)	Anticorps anti-PRP fixés aux particules de latex [1] (µg de protéines d'anticorps/ml de particules de latex)	Sensibilité des particules de latex anti-PRP [2] (ng de PRP/ml)
Ane	11 200	3,40	0,2
Lapin 1	96 000	7,84	1,0
2	68 000	7,20	1,0
3	45 000	6,56	5,0
4	10 300	1,95	10,0
Cheval	3 100	1,84	1000

[1] mesurés par détermination radio-immunologique par fixation d'antigène.

[2] concentration minimale en PRP-5 dans le sérum foetal de veau provoquant une agglutination égale ou supérieure à 2^+.

Le tableau 1 montre nettement l'importance de la qualité de l'antisérum utilisé pour sensibiliser les particules de latex sur la sensibilité du test d'agglutination des particules de latex pour la détection de l'antigène PRP. Les résultats du tableau 1 montrent nettement que l'on ne peut pas prévoir la sensibilité uniquement à partir de la concentration en PRP de l'antisérum mesurée par radiodétermination par fixation d'antigène. Un antisérum d'âne, ne contenant que 12% des anticorps du meilleur antisérum de

lapin, permet d'obtenir des particules de latex cinq fois plus sensibles. Cette différence de sensibilité ne peut s'expliquer par un revêtement plus efficace des particules de latex par les anticorps d'âne car il y a 2,3 fois plus d'anticorps absorbés sur les particules de latex revêtues d'antisérum de lapin. Les activités d'agglutination des antisérums d'âne et de lapin vis-à-vis des hématies de mouton revêtues de PRP sont égales bien que l'antisérum de lapin ait une activité bien supérieure de fixation du PRP.

La mesure des vitesses d'association montre que les anticorps d'âne se combinent bien plus rapidement avec l'antigène PRP que ne le font les anticorps de lapin. La période de demi-association est de 20 minutes pour les anticorps d'âne et de plus de 60 minutes pour les anticorps de lapin. La raison de cette différence des vitesses d'association est inconnue.

La vitesse de dissociation des complexes antigène-anticorps en présence d'un excès d'antigène, mesure la robustesse de la fixation ou l'affinité de l'anticorps. L'anticorps de lapin se dissocie plus lentement du polyribosephosphate que ne le fait l'anticorps d'âne et par conséquent a une plus grande affinité pour l'antigène. Ce résultat vient à l'appui de l'hypothèse selon laquelle la vitesse de combinaison de l'antigène et de l'anticorps est plus importante dans les processus d'agglutination que la robustesse de l'interaction antigène-anticorps.

b. Emploi d'une fraction de macroglobulines pour revêtir des particules de latex.

La chromatographie sur tamis moléculaire de différents antisérums dirigés contre des polysaccharides bactériens montre que la majorité des anticorps anti-polysaccharide des équidés (âne, cheval) est présente dans la classe des macroglobulines qui est éluée dans le volume vide de cette colonne. Au contraire, la majorité des anticorps de lapin est présente dans la classe des IgG qui est éluée ultérieurement. Comme indiqué dans le tableau 2, l'emploi de la fraction de macroglobulines de l'antisérum d'âne ou de cheval, à une concentration de 50 µg de protéine/ml pour sensibiliser les

particules de latex, améliore considérablement la sensibilité des antisérums d'équidés relativement faibles. Cette modification n'apporte pas d'amélioration complémentaire des meilleurs antisérums bien que la netteté de la réaction d'agglutination soit généralement meilleure avec la fraction correspondant au volume vide. L'emploi de la fraction d'IgG des sérums de lapin ne provoque pas d'améliorations comparables de la sensibilité ou de la netteté de l'agglutination.

Tableau 2

Comparaison des sensibilités des particules de latex revêtues de sérum entier ou de la fraction de macroglobulines d'antisérums d'équidés vis-à-vis de polysaccharides bactériens.

Animal	Antisérum dirigé contre :	Sensibilité * des particules de latex revêtues de sérum entier (dilution au 1/500)	Sensibilité des particules de latex revêtues de la fraction de macroglobulines (50 µg de protéines/ml)
Ane-F	H. influenzae type b	1 ng/ml	0,2 ng/ml
Ane-132	H. influenzae type b	0,2 ng/ml	0,2 ng/ml
Ane-W.J.	H. influenzae type b	2 ng/ml	0,5 ng/ml
Ane-Y	Neisseria meningitidis-groupe Y	1 ng/ml	0,2 ng/ml
Cheval-49	N. meningitidis groupe A	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml
Cheval-46	N. meningitidis groupe B	> 10 000 ng/ml	2 ng/ml

* la concentration la plus faible d'antigène provoquant une agglutination égale ou supérieure à 2^+ est indiquée.

c. Lavage des particules de latex revêtues

Pour améliorer encore la sensibilité des antisérums d'âne, on compare des particules de latex revêtues d'anticorps avec diverses dilutions d'antisérum d'âne dans du tampon salé à la glycine, non lavées ou après un, deux et trois lavages avec du tampon salé à la glycine contenant 1/1 000 parties de sérum foetal de veau ; les résultats figurent dans le tableau 3.

Tableau 3

Effet de la dilution de l'antisérum et du lavage des particules de latex sur la sensibilité du test d'agglutination des particules de latex par le polyribosephosphate.

Dilution de l'antisérum d'âne utilisé pour sensibiliser les particules de latex	Concentration minimale de PRP détectée * (ng/ml)			
	non lavées	lavées 1 fois	lavées 2 fois	lavées 3 fois
1/10	200	> 1000	> 1000	> 1000
1/100	50	0,5	0,5	0,5
1/500	2	0,2	0,2	0,2
1/1000	0,5	0,2	0,2	0,2
1/2000	0,2	0,2	0,2	0,5
1/5000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

* un résultat positif correspond à une agglutination égale ou supérieure à 2^+.

Comme le montrent les résultats du tableau 3, les faibles dilutions d'antisérum sont insensibles. Avec des dilutions de 1/500 et plus, on obtient la sensibilité maximale lorsque les particules de latex sont lavées. On obtient la sensibilité maximale avec les particules de latex non lavées uniquement dans une gamme étroite de dilutions. Deux lavages permettent d'obtenir la sensibilité maximale tandis que trois lavages peuvent réduire la sensibilité.

On conserve à 4°C les particules de latex sensibilisées de l'expérience de lavage et on les soumet à de nouveaux essais après 12 et 24 mois. Les particules de latex sensibilisées avec une dilution au 1/500 et au 1/1 000 d'antisérum d'âne et lavées deux fois conservent leur sensibilité d'origine tandis que les particules de latex non lavées sont deux à quatre fois moins sensibles après 24 mois.

d. Durée de la période d'incubation

La figure unique annexée illustre la relation entre la sensibilité de la détermination (mg de PRP/ml) en ordonnées et la durée d'incubation (minutes) en abscisses. Les courbes

indiquent la concentration minimale de PRP-5 détectée par agglutination des particules de latex après diverses périodes d'incubation. On considère qu'un résultat positif correspond à une agglutination égale ou supérieure à 2^+. La courbe Δ - Δ correspond aux particules de latex revêtues de l'antisérum de lapin n° 144 et la courbe o-o correspond aux particules de latex revêtues d'antisérum d'âne n° 132. Des concentrations importantes en antigène agglutinent les particules de latex en 5 minutes. La sensibilité s'accroît rapidement pendant les 45 à 60 premières minutes puis lentement pour atteindre un maximum de 0,05 ng/ml avec les préparations les plus sensibles après 10 heures. Le sérum d'équidé de l'invention est plus sensible que le sérum de lapin pour toutes les périodes d'incubation. Pour effectuer l'étude comparative, on mélange sur une lame pour sérologie, 50 µl de solution d'échantillon et 10 µl de particules de latex revêtues, comme décrit ci-après et on fait tourner à 180 tr/min à la température ordinaire. On recouvre les lames et on maintient l'humidité avec des éponges saturées d'eau chaude. On observe les lames aux temps indiqués.

Lorsqu'on accroît la période d'incubation de 5 minutes à 45 minutes ou plus, la sensibilité s'accroît de 10 à 20 fois. Pour l'emploi clinique, on choisit une période d'incubation de 45 minutes avec normalement des lectures à des intervalles de 5 à 15 minutes lorsqu'on utilise des particules de latex revêtues d'un antisérum d'équidé. Ces particules de latex ont une sensibilité de 0,2 ng d'antigène/ml de liquide.

On prévoyait que l'accroissement de la sensibilité des déterminations par agglutination de particules augmenterait la fréquence des agglutinations non spécifiques, et en fait dans le cas des échantillons de sérum, 69% des sérums d'enfants hospitalisés agglutinaient les particules de latex. Cet inconvénient majeur limitait la généralisation de ces déterminations. Les facteurs que l'on a impliqués dans l'agglutination des particules de latex revêtues de γ-globulines sont des composants thermolabiles du sérum

(vraisemblablement le complément) et des antiglobulines thermostables, dont de faibles teneurs sont souvent présentes dans les sérums humains en particulier chez les patients atteints d'affections inflammatoires chroniques.

L'agglutination non spécifique était établie par l'agglutination de particules de latex témoins sensibilisées par un sérum animal non immun. Lorsqu'on utilisait des particules de latex revêtues de macroglobulines, on revêtait les particules de latex témoins de la fraction de macroglobulines du sérum non immun.

Selon l'invention pour réduire la fréquence de l'agglutination non spécifique avec les sérums humains à 2% ou plus, (1) on ajoute le sérum animal non immun aux particules de latex sensibilisées, (2) on ajoute un tampon sérum contenant un polyanion et/ou un agent réducteur directement au mélange d'incubation et/ou (3) on inactive les sérums par la chaleur.

On détermine la fréquence de l'agglutination non spécifique avec des sérums d'enfants et d'adultes hospitalisés qui, ne sont pas atteints de maladie à H.i.b.. On teste tous ces sérums avec des particules de latex sensibilisées avec de l'anti-sérum d'âne (particules de latex anti-PRP) et avec des particules de latex sensibilisées avec du sérum d'âne non immun (particules de latex témoins).

Dans des expériences préliminaires, on teste des sérums contenant des agglutinines thermostables par addition de 10 µl d'un agent réducteur, tel que le dithio-1,4 thréitol (DTT) ou le mercapto-2 éthanol (ME), ajouté au mélange d'incubation au début de l'incubation. Les concentrations optimales sont de 0,018 M pour le DTT et de 0,35 M pour le ME (les concentrations finales dans le mélange d'incubation sont de 0,0026 M pour le DTT et de 0,05 M pour le ME).

Le tableau 4 suivant regroupe les résultats obtenus avec 104 sérums d'enfants conservés au moins 24 heures à 4°C avant l'essai.

Tableau 4

Fréquence de l'agglutination non spécifique avec des sérums conservés[1] d'enfants hospitalisés n'étant pas atteints de maladie à Haemophilus influenzae type b.

Agglutination avec les particules de latex anti-PRP	négative	positive	négative	positive
Agglutination avec les particules de latex témoin	négative	positive	positive	négative
Sérum non traité (N=104)	32 (31%)	65 (63%)	3 (3%)	4 (4%)
Sérum inactivé par chauffage (n=104)	49 (47%)	47 (45%)	1 (1%)	7 (7%)
Addition de sérum normal d'âne (2,5%) aux particules de latex (n=104)	72 (69%)	23 (22%)	7 (7%)	2 (2%)
Inactivation du sérum par chauffage et addition de sérum normal d'âne (2,5%) aux particules de latex(n=104)	75 (72%)	23 (22%)	5 (5%)	1 (1%)
Addition de sérum normal d'âne (2,5%) aux particules de latex et addition de DTT[2] au sérum (n=53)[3]	52 (98%)	1 (2%)	0	0

[1] conservés au moins 24 heures à 4°C avant l'essai.

[2] dithiothréitol, concentration finale de 0,0026 M dans le mélange d'incubation

[3] seuls 53 échantillons sur 104 contiennent suffisamment de sérum pour effectuer cet essai.

Avec les particules de latex anti-PRP, 69% des sérums provoquent des agglutinations non spécifique mais toutes (sauf 4%) sont identifiées avec les particules de latex témoin.

L'inactivation par la chaleur (60°C pendant 15 minutes) ne réduit que faiblement à 53% l'agglutination non spécifique et l'addition de sérum d'âne non immun aux particules de latex anti-PRP et aux particules de latex témoins réduit

l'agglutination non spécifique à 31% ; l'addition de 10 µl d'un agent réducteur, par exemple le dithiothréitol réduit la fréquence des réactions non spécifiques à 2%. Les résultats obtenus avec les 52 sérums conservés d'adultes sont semblables. Seul un sérum produit une agglutination non spécifique (positive avec les particules de latex anti-PRP et les particules de latex témoins) lorsqu'on ajoute 2,5% de sérum normal d'âne aux particules de latex et du DTT au mélange d'incubation.

Pour déterminer si les sérums frais produisent des agglutinations non spécifiques fréquentes, on recueille 100 sérums d'adultes que l'on place immédiatement sur de la glace et qu'on teste le jour même. On teste chaque sérum avec et sans agent réducteur (ME) et avec et sans inactivation par la chaleur (60°C pendant 5 minutes). On teste l'agglutination avec des particules de latex anti-PRP et des particules de latex témoins contenant chacune 2,5% de sérum normal d'âne et dans les deux cas on observe des résultats correspondants.

Les schémas d'agglutinations figurent dans le tableau 5.

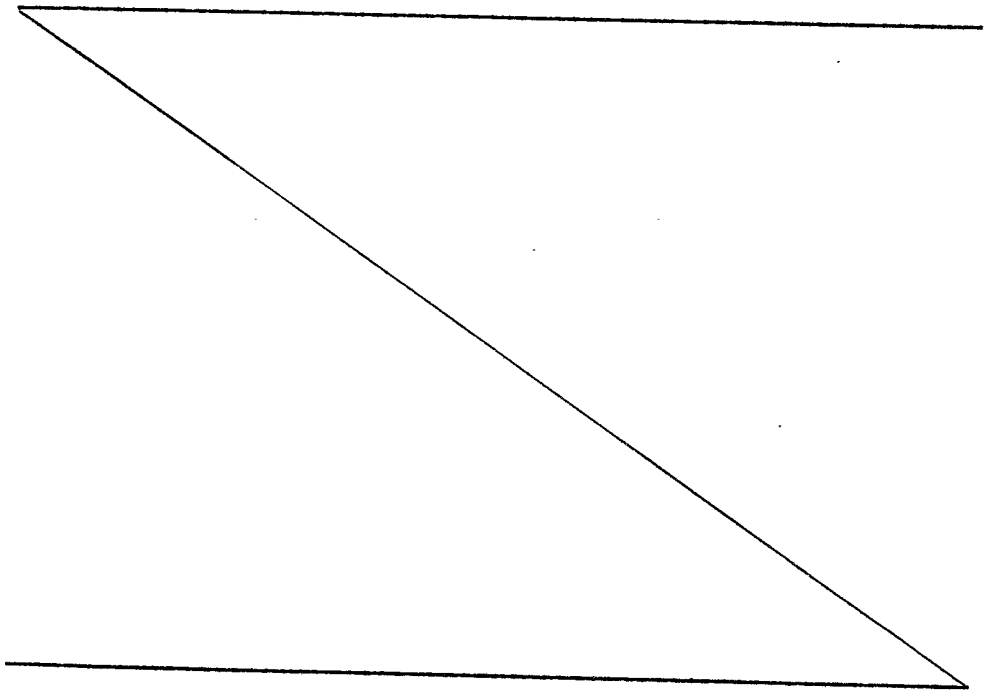


Tableau 5

Agglutination non spécifique avec des sérums frais de 100 adultes sans affection par Haemophilus influenzae type b[1].

Schéma	Pas d'inactivation par chauffage		Inactivation par chauffage		Nombre de sérums	Interprétation
	sans ME	ME[2]	sans ME	ME[2]		
1.	(-)	(-)	(-)	(-)	43	pas d'antiglobuline - pas de complément
2.	(+)	(-)	(+)	(-)	28	antiglobulines seulement
3.	(+)	(+)	(-)	(-)	4	complément seulement
4.	(-)	(+)	(-)	(-)	14	complément seulement ("réactivé" par le ME)
5.	(+)	(+)	(+)	(-)	10	antiglobulines et complément
6.	(-)	(-)	(-)	(+)	1	
N° de sérum produisant l'agglutination non-spécifique	42	38	38	1		

[1] On effectue toutes les déterminations avec des particules de latex anti-PRP et des particules de latex témoins contenant 2,5% de sérum normal d'âne. Il existe une correspondance complète des résultats pour les particules de latex anti-PRP et les particules de latex témoins.

[2] mercapto-2 éthanol, à la concentration finale de 0,05 M dans le mélange d'incubation.

On observe une agglutination non spécifique avec 42% des sérums non traités (ni chauffage ni agent réducteur). Lorsqu'on ajoute un agent réducteur (ME) 28 sérums deviennent négatifs (schéma 2) ce qui indique la présence d'antiglobuline Quatorze sérums qui étaient au départ négatifs deviennent positifs (schéma 4) ce qui indique qu'une agglutinine

thermolabile a été réactivée par le mercaptoéthanol. L'effet global du ME seul est de réduire l'agglutination non spécifique à 38%. On obtient une fréquence semblable d'agglutinations non spécifiques avec l'inactivitation par la chaleur seule. Cependant la combinaison de l'inactivation des sérums par la chaleur et de l'addition d'un agent réducteur au mélange d'incubation, réduit la fréquence de l'agglutination non spécifique à une valeur de 2% ou moins.

Comme l'inactivation par la chaleur est longue, on a mis au point un autre procédé pour éliminer l'agglutination non spécifique provoquée par les facteurs thermolabiles du sérum. Divers polyanions y compris le polyéthanolsulfonate de sodium (SPS), le sulfate de dextrane, la carraghénine et l'héparine empêchent l'agglutination non spécifique par les facteurs thermolabiles du sérum des particules de latex revêtues de globuline.

On teste 100 sérums frais d'adultes avec un tampon sérum contenant à la fois du ME (comme ci-dessus) et du SPS à la concentration de 0,05%. Seul un des 100 sérums produit une agglutination non spécifique avec les particules de latex anti-PRP et les particules de latex témoins. Le chauffage supprime l'agglutination non spécifique par ce sérum.

Il est souhaitable d'ajouter un tampon sérum contenant un agent réducteur et un polyanion au mélange d'incubation constitué de particules de latex sensibilisées stabilisées et d'un échantillon de sérum.

On prépare ce tampon sérum de la façon suivante :

On dilue du mercapto-2 éthanol 14 M (solution standard concentrée) au 1/40 dans du tampon salé à la glycine (GBS) (0,1 M en glycine, 0,9% de chlorure de sodium, pH 8,2). Dans le même GBS, on dilue au 1/00 une solution aqueuse à 5% de polyéthanolsulfonate de sodium.

Le tampon sérum peut contenir d'autres agents réducteurs tels que le dithiothréitol, le glutathion, la cystéine et similaires au lieu du mercapto-2 éthanol. De plus on peut utiliser d'autres polyanions tels que le sulfate de dextrane, l'héparine, la carragéénine et similaires sous réserve qu'ils

ne gênent pas la réaction antigène-anticorps.

Le tableau 6 suivant montre les concentrations optimales des composants du tampon sérum. Des concentrations plus élevées en agents réducteurs ou en polyanions réduisent la sensibilité de la détermination et des concentrations plus faibles ne suppriment pas l'agglutination non spécifique de tous les sérums.

Tableau 6

Concentrations optimales des composants du tampon sérum.

	DTT	2-ME	SPS
	Concentration finale dans le mélange de détermination		
Diminution de la sensibilité	12,8 mM	400 mM	0,07%
Bonne sensibilité et élimination de l'agglutination non spécifique	2,6 mM	50 mM	0,007%
L'agglutination non spécifique n'est pas éliminée	0,65 mM	10 mM	0,0007%

On examine à nouveau la concentration efficace du sérum animal non immun dans la suspension de latex, dans le système de détermination utilisant le tampon sérum précédemment décrit.

Des concentrations en sérum animal non immun inférieures à 0,25% dans la suspension de particules (moins de 0,035% dans le mélange final de détermination) provoquent une agglutination non spécifique occasionnelle malgré l'emploi du tampon sérum.

Des concentrations en sérum animal non immun atteignant environ 25% dans la suspension de latex (3,5% dans le mélange final de détermination) sont efficaces pour réduire la fréquence de l'agglutination non spécifique, cependant la concentration maximale, c'est-à-dire 25%, réduit de 2 fois la sensibilité de la détermination du polyribophosphate.

Agglutination non spécifique dans d'autres liquides de l'organisme.

La plupart des échantillons d'urine produisent une agglutination non spécifique avec les particules de latex anti-PRP et les particules de latex témoins. On peut éliminer cette agglutination soit par chauffage (100°C pendant 5 minutes) soit par filtration de l'urine. Dans le mode de réalisation préféré on utilise un filtre de 0,45 µm.

Il est très rare que les échantillons de liquide céphalorachidien produisent une agglutination non spécifique, et on l'élimine par chauffage (100°C pendant 5 minutes). L'antigène PRP demeure stable dans ces opérations de chauffage et de filtration.

L'exemple non limitatif suivant illustre le mode de réalisation préféré de l'invention.

EXEMPLE

a. Revêtement des particules de latex.

Pour préparer les particules de latex anti-PRP, on dilue au 1/500 dans du GBS de l'antisérum entier d'âne dirigé contre H. influenzae type b et on chauffe à 56°C pendant 30 minutes. On ajoute 1 partie de suspension de latex (suspension à 10% de particules de 0,81 µm de diamètre dans l'eau distillée) à 80 parties d'antisérum dilué pour obtenir une concentration finale des particules de latex de 0,125%. On incube ce mélange pendant une heure à la température ordinaire, on centrifuge à 12 000 x g pendant 10 minutes puis on rejette le surnageant. On remet le culot en suspension dans un volume égal de GBS contenant 0,1% de sérum non immun d'âne, on centrifuge comme ci-dessus puis on remet en suspension dans un volume égal de GBS contenant 2,5% de sérum non immun d'âne. On prépare les particules de latex témoins comme ci-dessus si ce n'est qu'on utilise du sérum non immun d'âne dilué au 1/500 dans le GBS pour le revêtement initial des particules de latex. Le sérum non immun d'âne que l'on utilise doit être le sérum prélevé avant l'immunisation à l'animal que l'on immunise.

Lorsqu'on utilise la fraction de macroglobulines, on chromatographie les sérums entiers d'âne prélevés avant l'immunisation et après l'immunisation sur une colonne

filtrante garnie de gel Sephacryl G-200 et on regroupe les fractions éluées dans le volume vide de la colonne. On dilue l'ensemble à une concentration en protéines de 50 µg/ml dans du GBS et on utilise la dilution au lieu du sérum entier dilué dans le procédé précédemment décrit.

b. Préparation du tampon sérum.

On dilue au 1/40 dans du GBS, du mercapto-2 éthanol 14 M (solution concentrée standard). On ajoute du polyéthanol-sulfonate de sodium à la concentration finale de 0,05%.

c. Mode de détermination.

On effectue la détermination selon l'invention de la façon suivante.

On introduit 50 µl de sérum témoin positif, de sérum témoin négatif et d'échantillon de sérum de liquide céphalo-rachidien et d'urine dans les deux rangées de cupules d'une lame propre et sèche pour sérologie selon le diagramme ci-après. Le sérum témoin positif contient 2 ng d'antigène PRP/ml. Le sérum témoin négatif contient des antiglobulines qui agglutinent à la fois les particules de latex anti-PRP et les particules de latex témoins en l'absence d'addition de tampon sérum, ce qui permet de contrôler l'activité du tampon sérum. On filtre au préalable les échantillons d'urine avec un filtre de 0,45 µm.

	Sérum témoin positif	Sérum témoin négatif	Sérum étudié	Liquide céphalo-rachidien étudié	Urine étudiée
Rangée A : particules de latex anti-PRP	(TS)	(TS)	(TS)	○	○
Rangée B : particules de latex témoins	(TS)	(TS)	(TS)	○	○

TS : addition de tampon sérum

On ajoute 10 µl de tampon sérum aux godets contenant du sérum témoin positif, du sérum témoin négatif ou un échantillon de sérum.

On mélange doucement les suspensions de latex sans former de mousse et on ajoute 10 µl de particules de latex

anti-PRP à une des rangées (rangée A) et on mélange intimement les réactifs.

On ajoute 10 µl de particules de latex témoin aux godets de la seconde rangée et on agite intimement les réactifs.

On place la lame sur un agitateur pour sérologie et on la fait tourner pendant environ 45 minutes. On doit humidifier la chambre avec des éponges trempées dans l'eau chaude pour qu'une condensation soit visible pendant toute la détermination. On retire les lames de la chambre, on essuie la condensation et on lit l'agglutination en basculant lentement les lames en lumière oblique sur un fond sombre. On note les résultats de la façon suivante : 4^+ gros amas-fond limpide
3^+ gros amas-fond laiteux
2^+ petits amas
1^+ grains fins
0 laiteux

On doit facilement différencier les réactions 3^+ et 4^+ des témoins lorsqu'on observe la lame à bout de bras. Les réactions 2^+ nécessitent un examen plus rapproché.

Interprétation des résultats.

Particules de latex anti-hoemophilus	Particules de latex témoins	Interprétation
(+)	(-)	Positif pour l'antigène H. influenzae type b.
(-)	(-)	Négatif pour l'antigène H. influenzae type b.
(+)	(+)	Agglutination non spécifique l'antigène H. influenzae type b, peut être présent ou absent.

Une agglutination positive à 2^+ doit être considérée comme "faiblement positive".

Bien que dans la présente description les durées et les températures utilisées pour le traitement par la chaleur et l'incubation soient optimales, on peut obtenir des résultats identiques avec des températures plus élevées pour des durées plus brèves ou inversement des températures plus basses pour

des durées plus importantes. De plus dans la description précédente, on utilise des réactifs, des milieux et des techniques pour établir l'utilité de l'invention. Il est cependant évident pour l'homme de l'art que l'on peut effectuer des modifications des techniques, des durées, des volumes et des natures des matières, des milieux et des appareils sans sortir du cadre de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer un réactif qui s'agglutine lorsqu'on le met en contact avec des liquides de l'organisme contenant des antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes selon lesquelles :

on injecte une certaine quantité d'antigènes à une espèce animale, en particulier une espèce d'équidés telle que l'âne, et on laisse l'espèce animale produire un antisérum dirigé contre l'antigène ;

on recueille l'antisérum ainsi produit ;

on dilue cet antisérum dans un système tampon physiologique compatible ;

on mélange la solution d'antisérum ainsi obtenue à une suspension de particules ;

on incube la suspension ;

on centrifuge cette suspension et on décante l'antisérum non adsorbé ;

on remet le culot ainsi obtenu en suspension dans un système tampon physiologique compatible ; et

on centrifuge à nouveau et on remet le culot en suspension dans ledit système tampon contenant un sérum animal non immun de la même espèce que celle ayant servi à la préparation de l'antisérum.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on choisit l'antigène parmi le groupe constitué par les polysaccharides.

3. Procédé pour préparer un réactif qui s'agglutine lorsqu'on le met en contact avec des liquides de l'organisme contenant des polysaccharides, caractérisé en ce qu'il comprend :

l'injection d'une certaine quantité d'un polysaccharide à une espèce d'équidé, en particulier l'âne, pour produire un antisérum dirigé contre cet antigène ;

la récupération de l'antisérum ainsi produit ;

la sélection des fractions à titre élevé en macroglobulines de l'antisérum recueilli ;

la dilution de ces fractions dans un système tampon

physiologique compatible ;

la combinaison de l'antisérum dilué à une suspension aqueuse de particules ;

l'incubation de la suspension ;

la centrifugation de la suspension et la décantation de l'antisérum non adsorbé ;

la remise en suspension du culot ainsi obtenu dans un système tampon physiologique compatible ; et

la centrifugation à nouveau et la remise en suspension du culot dans ledit système tampon contenant du sérum d'équidé non immun.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le polysaccharide est le polyribophosphate constituant le polysaccharide capsulaire d'Haemophilus influenzae type b.

5. Réactif liquide s'agglutinant lorsqu'on le met en contact avec des liquides contenant des antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend un support revêtu d'un antisérum animal, en particulier un antisérum entier d'équidé, en particulier la fraction de macroglobulines d'un antisérum d'équidé, dirigé contre lesdits antigènes en suspension dans un système tampon physiologique compatible et d'un sérum animal non immun de la même espèce animale que celle utilisée pour produire l'antisérum.

6. Réactif liquide selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'antigène est un polysaccharide.

7. Test direct d'agglutination pour la détection d'antigènes dans des liquides de l'organisme susceptibles de contenir de tels antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend la combinaison d'un échantillon de liquide de l'organisme choisi parmi le sérum ou le plasma, avec un réactif liquide selon la revendication 5 et un système tampon contenant un polyanion capable de réduire l'effet des constituants thermolabiles de l'échantillon en particulier le polyéthanolsulfonate de sodium, le sulfate

de dextrane, la carlagénine, l'héparine et similaires et un agent réducteur capable de réduire les anticorps de type antiglobulines de l'échantillon, en particulier le mercapto-2 éthanol, le dithiothréitol, le glutathion, la cystéine et similaires, l'incubation de ce mélange puis la détermination visuellement du degré d'agglutination.

8. Test direct d'agglutination pour la détection d'antigènes dans les liquides de l'organisme choisis parmi le groupe constitué par le sérum et le plasma susceptible de contenir de tels antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend le chauffage de ce liquide de l'organisme et la combinaison de ce liquide de l'organisme traité par la chaleur avec un agent réducteur capable de réduire les anticorps de type antiglobulines de ce liquide, en particulier le mercapto-2 éthanol, le dithiothréitol, le glutathion, la cystéine et un réactif liquide selon la revendication 5, l'incubation de ce milieu puis la détermination visuellement du degré d'agglutination.

9. Test direct d'agglutination selon la revendication 7, caractérisé en ce que la période d'incubation est de 45 minutes ou plus.

10. Test direct d'agglutination pour la détection d'antigènes dans un liquide céphalorachidien susceptible de contenir ces antigènes, caractérisé en ce qu'il comprend la combinaison de ce liquide céphalorachidien avec un réactif liquide de la revendication 5, l'incubation du mélange puis la détermination visuellement du degré d'agglutination.