

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 24.02.99.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 25.08.00 Bulletin 00/34.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SCIBIEX Société à responsabilité limi-
tée — FR.

⑦② Inventeur(s) : DEMAN LOONIS HELENE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CHATEAU PASCALE.

⑤④ PROCÉDE D'ANALYSE IMMUNOLOGIQUE PAR REACTION D'ADHERENCE.

⑤⑦ Ce brevet est une extension du brevet n° FR 9405123.
Il décrit un procédé mettant en oeuvre des réactions d'adhé-
rence ou d'inhibition d'adhérence pour la réalisation d'un
test immunologique utilisé dans la recherche d'anticorps na-
turels (épreuve de Simonin) ou immuns.

Le procédé découle du fait observé que des globule-
tests en suspension faible (0, 2%) en présence de plasma
dilué (1/4) ne s'agglutinent pas de façon visible à l'oeil avant
au moins une heure d'incubation, malgré la présence d'an-
ticorps naturels anti-A et anti-B.

Ces anticorps, cependant, se fixent bien sur les antigè-
nes qui leur correspondent. Il devient alors possible d'appli-
quer la technologie d'adhérence sans effet de filtration
différentielle malgré la présence d'un coussin hydratant
comportant un gel de Sephacryl et ainsi, de mettre en évi-
dence la fixation des anticorps anti-A et anti-B par adhéren-
ce ou inhibition d'adhérence sur une phase solide
sensibilisée constituée par le fond des cupules. Cette tech-
nologie fait intervenir l'effet "pressoir" du gel qui augmente
le contact obligé des hématies avec la phase solide et con-
séquent, exacerbe la sensibilité du test. Le coussin hy-
dratant prolonge la stabilité des anticorps fixés et dispense
de phase de lavage grâce à l'effet gradient du liquide conte-
nu dans les cuvettes scellées.



PROCEDE D'ANALYSE IMMUNOLOGIQUE
par Réaction d'ADHERENCE

- 5 La présente invention est une extension du brevet n° FR 9405123 : " Dispositif et Procédé d'analyse immunologique ".
Elle permet la recherche d'anticorps agglutinants de type IgM dans le dispositif BilOba® et en particulier la mise en œuvre de la réaction de Simonin, encore appelée contre-épreuve, épreuve sérique ou épreuve indirecte, utilisée dans les
10 groupages sanguins.

Traditionnellement, les groupages sanguins sont réalisés par deux épreuves complémentaires.

- 15 La première est l'épreuve directe appelée aussi épreuve de Beth-Vincent.
Elle consiste à rechercher la présence d'antigènes A et B à la surface des hématies d'un propositus donné. Cette épreuve utilise des sérum-tests anti-A et anti-B.
- 20 La deuxième est l'épreuve indirecte ou contre-épreuve appelée aussi épreuve de Simonin.
Elle consiste à rechercher la présence d'anticorps anti-A et anti-B dans le sérum ou le plasma du propositus. Cette épreuve utilise des globule-tests A₁, A₂, et B.
- 25 Les résultats observés lors de l'épreuve indirecte viennent confirmer ceux observés lors de l'épreuve directe car il est connu que dans le sang humain, des anticorps anti-A et anti-B sont systématiquement et naturellement présents chaque fois que l'antigène correspondant est absent sur les hématies.

- 30 Cette règle conduit au tableau d'interprétation suivant :

Globules rouges de type	A ₁	A ₂	B	A ₁ B	A ₂ B	O
Anticorps présents dans le sérum	Anti-B	Anti-B	Anti-A	aucun	aucun	Anti-A+B

- Les techniques utilisées pour la mise en évidence soit des antigènes avec des anticorps connus ou sérum-tests, soit des anticorps avec des globules rouges connus ou globule-tests sont multiples. Les plus traditionnelles sont celles
35 réalisées sur lames, en tubes ou en microplaques (appelées aussi plaques de microtitration). Les techniques de la nouvelle génération, plus récentes, sont des techniques de filtration en micro-colonne dites aussi techniques de micro-filtration. Cependant, quelque soit le support utilisé par chacune d'entre elles, toutes ces techniques exploitent les phénomènes d'agglutination selon lesquels,
40 chaque fois qu'un antigène porté par un globule rouge est mis en présence d'un anticorps de même spécificité, il y a formation d'agglutinats.

Dans les techniques sur lames, l'agglutination est spontanée, c'est à dire visible à l'œil après quelques secondes ou minutes d'agitation douce : un simple mouvement de "chaloupe" de la lame est suffisant en raison des fortes concentrations de globules utilisées : 10%.

- 5 Dans les techniques en tubes et en microplaques, l'agglutination est amplifiée et accélérée par une centrifugation.

Les techniques de micro-filtration, développées originellement par Yves Lapiere et exploitées par Diamed, mettent en œuvre un gel de Sephadex dans une micro-colonne. Les agglutinats, qui se forment soit spontanément dans la
10 chambre de réaction située au sommet de la colonne, soit au contact de réactifs présents dans la colonne de gel (par simple imbibition, ou encore par coating de particules de gel, ce qui en fait n'est qu'une variante du procédé de base de Lapiere), sont poussés par force centrifuge au travers du dit - gel contenu dans la micro-colonne. Le gel agit alors comme un filtre laissant passer les hématies
15 libres qui viennent se concentrer au fond de la micro-colonne. Par contre le gel retient les hématies agglutinées avec d'autant plus de résistance que les agglutinats sont importants. La position des agglutinats ainsi retenus dans la micro-colonne est en rapport avec l'intensité de l'agglutination.

A ce jour, aucune technique de phase solide, faisant appel aux réactions
20 d'adhérence, ne permet la réalisation simple d'une contre-épreuve. Seul le procédé BilOba® permet une telle approche.

Le procédé BilOba® (tel que décrit dans le brevet initial FR 9405123) est caractérisé par l'association de deux sous-ensembles : " Bil " ou chambre d'incubation et " Oba " ou chambre à réaction. Ces deux éléments associés au
25 moment de la réalisation d'une analyse permettent en particulier de révéler une réaction antigène – anticorps par simple centrifugation et réaction d'adhérence sur le fond de la chambre " Oba ".

Les techniques de phase solide permettent de mettre en évidence la présence
30 ou l'absence de réactions d'adhérence entre des molécules fixées (anticorps ou antigènes) sur un support solide tel que (mais ceci n'est pas limitatif) sur le fond de cuvettes en matière plastique et des molécules présentes sur des hématies (ou des particules) dirigées et / ou sensibilisées contre les molécules fixées (antigènes ou anticorps).

35 En règle générale, la présence de réactions d'adhérence traduit une réaction biologique positive et l'absence de réaction d'adhérence traduit une réaction biologique négative.

Dans le procédé " BilOba ", la présence d'un coussin hydratant dans la partie
40 " Oba " permet d'assurer trois fonctions :

- . une hydratation de la couche sensible fixée sur le fond des cuvettes procurant aux anticorps ou antigènes fixés une stabilité de plusieurs mois (alors qu'elle n'est que de quelques semaines pour des anticorps déshydratés
- . un effet gradient, tel que décrit dans le brevet européen de STOCKER
45 (81110764.8) mais aujourd'hui abandonné. Cet effet gradient concoure à

dispenser des étapes de lavage pour éliminer les protéines non fixées aux hématies.

un effet " presseur " : au cours de la centrifugation, le gel assure un effet de placage des hématies contre la paroi du fond des cuvettes, et ceci augmente de façon significative les conditions de contact entre les antigènes erythrocytaires et les anticorps coatés sur le fond de la cuvette. Le coussin hydratant favorise ainsi les liaisons antigène-anticorps et conséquemment, augmente la sensibilité des réactions et donc les performances du procédé.

Nous rappelons ci-dessous, par deux exemples non limitatifs, les modalités de fonctionnement du procédé BilOba, tel que décrit dans le brevet initial, afin de bien comprendre le fonctionnement du procédé étendu à la contre-épreuve ABO.

Exemple 1 : Dans le cadre de l'épreuve directe, si la molécule fixée est une molécule d'anticorps (sérum-tests), une réaction d'adhérence (notée de une à quatre croix suivant l'intensité de la réaction) entre les globules rouges et les anticorps fixés, traduira une réaction biologique positive indiquant que les globules rouges sont porteurs d'antigènes contre lesquels sont dirigés le sérum-tests.

Au contraire, l'absence de réaction d'adhérence (notée -) traduira une réaction biologique négative signifiant que les globules rouges ne sont pas porteurs des antigènes contre lesquels sont dirigés le sérum-tests.

Exemple 2 : De même, dans le cadre de la Recherche d'Anticorps Irréguliers, si la molécule fixée est une molécule d'antiglobuline, une réaction d'adhérence entre l'antiglobuline et des hématies sensibilisées par un anticorps dirigé contre un antigène présent sur ces hématies, traduira une réaction biologique positive. Contrairement, l'absence de réaction d'adhérence signifiera que les hématies n'ont pas été sensibilisées par un anticorps dirigé contre les antigènes présents sur ces hématies et donc traduira une réaction biologique négative.

La technique décrite ici est originale et innovante parce qu'elle utilise une technique de phase solide adaptée à la contre-épreuve, ce qui n'a jamais été décrit ou utilisé en pratique et de façon aussi simple.

Cette technique est donc une extension des applications décrites dans le brevet initial FR 9405123.

Cette technique découle de l'observation originale suivante : lorsque, dans une cuvette " Bil " du dispositif " BilOba ", on met en présence un sérum ou un plasma d'un donneur de sang ou d'un malade, (que l'on nommera ici propositus) et des Hématies-tests (A1, A2, B, et O), en suspension à 0.2% (concentration préconisée dans la technique BilOba), il est remarquable qu'aucune agglutination n'apparaît de façon visible avant au moins une heure d'incubation à la température du laboratoire. Par contre, si des anticorps naturels anti-A et anti-B sont présents dans le sérum du propositus, ceux-ci sont capables de se fixer sur les sites antigéniques correspondant des Hématies-tests.

La mise en évidence de cette fixation, encore appelée " sensibilisation " est réalisée de deux façons :

5 . par adhérence directe en présence d'anticorps anti-IgM ou encore par coating des cuvettes avec de la protéine A ou G (qui ont la faculté de s'associer aux immunoglobulines), ou tout autre moyen de liaison aux protéines et spécifiquement globulines d'anticorps

. par inhibition d'adhérence en présence d'anticorps anti-A et anti-B

10 Les anticorps naturels anti-A et anti-B viennent masquer les antigènes de même spécificité et, de ce fait, inhibent leur capacité d'adhérence avec des anticorps de même type fixés sur le fond de la cuvette " Oba " .

Deux méthodes de mise en évidence de la réaction antigène - anticorps dans le système ABO, et dans la technologie originale BilOba deviennent alors utilisables :

15 . une méthode d'inhibition d'adhérence mettant en œuvre des anticorps anti-A et anti-B

20 Les antigènes erythrocytaires ainsi " coiffés " d'une molécule d'anticorps deviennent inaccessibles aux anticorps de même type fixés sur le support plastique. L'adhérence n'est donc plus possible. Par contre, les antigènes non sensibilisés peuvent adhérer si les anticorps fixés sur " Oba " leur correspondent.

25 On peut de la sorte mettre en évidence, dans un système parfaitement ajusté, une diminution voire une inhibition complète de l'adhérence en présence d'anticorps de même spécificité.

30 . une méthode d'adhérence directe mettant en œuvre des réactants capables de s'associer aux anticorps fixés sur les Hématies-tests , tels des anticorps anti-globulines humaines ou de la protéine A ou G, et ce , de façon non limitative.

Les réactions d'inhibition d'adhérence sont décrites de façon explicite dans le tableau ci-dessous :

35 CONTRE EPREUVE BilOba® par inhibition d'adhérence spécifique

Globule-tests	Sang de groupe								Phase solide Sérum-test
	A		B		AB		O		
A ₁	1	++++	5	-	9	++++	13	-	Anti-A
A ₂	2	+++	6	-	10	+++	14	-	Anti-A
B	3	-	7	++++	11	++++	15	-	Anti-B
O	4	-	8	-	12	-	16	-	Anti-AB

- Une réaction positive entre l'anticorps d'un sujet donné et des globule-tests se traduit non pas par une réaction d'adhérence avec le sérum-test fixé au plastique mais par une inhibition de cette réaction d'adhérence (notée -) :

réactions 3, 5, 6, 13, 14 et 15. Ceci se traduit, après centrifugation, par la présence d'un culot central d'hématies, sous forme de point plus ou moins concentré.

- 5 - Une réaction négative entre l'anticorps d'un sujet donné et des globule-tests se traduit par une réaction d'adhérence (notée ++++ à +) si les antigènes présents sur les hématies correspondent au sérum-test fixé au plastique : réactions 1, 2, 7, 9, 10 et 11.

10 On pourra valablement ajouter des hématies pour contrôle donnant systématiquement une réaction négative, permettant de s'assurer que la bonne quantité d'hématies a bien été ajoutée au cours de la procédure et son déroulement. Voir les réactions 4, 8, 12 et 16

La lecture de la contre-épreuve BilOba® en technique d'inhibition d'adhérence est donc inversée par rapport à celle de la contre-épreuve traditionnelle :

15

CONTRE EPREUVE BilOba par adhérence directe mettant en œuvre des anti-globulines anti-IgM ou anti-chaines lourdes, ou Protéines A ou G ou enfin équivalents.

20

Globule-tests	Sang de groupe			
	A	B	AB	O
A ₁	-	++++	-	++++
A ₂	-	+++	-	++++
B	++++	-	-	++++
O	-	-	-	-

25 Ces hématies peuvent donc être centrifugées avant une heure, avant sédimentation, au travers d'un coussin hydratant dans lequel aucune retenue ne s'opère, ce qui est une différence fondamentale avec les techniques en gel (telles que celles mises en œuvre dans le procédé Diamed) dont le fondement repose sur la migration différentielle des hématies au travers d'un gel en fonction de leur degré d'agglutination.

30 Telles sont les bases de cette technologie d'adhérence appliquée à l'épreuve de Simonin.

35 Les réactions de compétition d'antigènes ou d'anticorps sont connues dans les pratiques immunologiques telles que l'ELISA mais aucune n'a jamais été appliquée avec succès aux groupages sanguins par inhibition d'adhérence. D'abord parce que seule la technologie BilOba® permet de réaliser des groupages sanguins en adhérence humide avec une sensibilité suffisante et démontrée. Ensuite parce que l'absence d'agglutination spontanée en milieu de suspension faible d'hématies n'a jamais été ni rapportée ni exploitée.

Dans le cas de la contre-épreuve prise ici comme exemple non limitatif, le fond des cuvettes " Oba " est sensibilisé par des anticorps de même type que ceux réagissant avec les antigènes A et B, c'est à dire des sérum-tests anti-A, anti-B et anti-AB. On aura avantage à utiliser des anticorps monoclonaux de type IgM, voire IgG, tels que largement disponibles sur le marché international.

5 Pour permettre l'analyse d'un seul échantillon, deux, trois ou quatre tests sont envisageables. Le sérum-test anti-A pourra être fixé sur une cuvette si une seule hématie de type A est utilisée ou sur deux cuvettes distinctes (réalisation de deux tests, l'un avec des hématies A₁, l'autre avec des hématies A₂), les
10 sérum-tests anti-B et anti-AB chacun sur une cuvette (réalisation d'un test avec des hématies B et d'un autre avec des hématies O).

La couche sensible est ensuite recouverte d'un coussin hydratant qui peut être un liquide seul, à effet gradient ou ce même liquide auquel on adjoint un gel de
15 dextran, de Sephadex ou Sephacryl ou encore tout autre gel procurant une capacité accrue de rétention d'eau pour augmenter la conservation du produit et donc améliorer sa stabilité..

La cuvette " Oba " est enfin scellée par un opercule en aluminium comme décrit dans le brevet de base et se conserve pendant plusieurs mois entre 2 et 8°C.

20

Pour bien comprendre la chronologie des phases de cette technique, nous donnons ci-dessous à titre d'exemple non limitatif, la méthodologie d'utilisation d'une contre-épreuve réalisée avec des hématies A₁, A₂, B et O.

25 1 – Une plaque " Bil " est sertie sur une plaque " Oba ".

2 – 30 µl d'un milieu de dilution, eau physiologique par exemple, sont déposés dans quatre cuvettes " Bil ". Ces quatre cuvettes " Bil " correspondent à quatre
30 cuvettes " Oba " sensibilisées par des anticorps anti-A pour Oba 1 et Oba 2 , un anticorps anti-B pour Oba 3 : : et un anticorps anti-A+B pour Oba 4.

3 – 10 µl de plasma ou de sérum d'un patient ou d'un donneur de sang sont déposés dans ces quatre mêmes cuvettes : soit le plasma d'un sujet A pour cet
35 exemple.

35

4 – 30 µl d'hématies A₁, A₂, B et O en suspension à 0,2% dans le même milieu de dilution que celui déposé précédemment (de l'eau physiologique dans cet
40 exemple) sont ajoutées respectivement dans la première, la deuxième, la troisième et la quatrième cuvette.

40

5 - Une incubation de 5 minutes à température ambiante est respectée.

6 - Le dispositif BilOba® est centrifugé pendant 4 minutes à 1000 g.

45

7 – La lecture s'opère comme suit :

Pendant la centrifugation, les hématies vont diffuser au travers de la solution hydratante, s'y disperser de façon homogène et venir au contact des parois du fond de " Oba ".

5 Si le " coiffage " ou la sensibilisation des hématies a eu lieu dans " Bil " pendant l'incubation, les hématies ne pourront plus adhérer totalement aux anticorps fixés sur " Oba " et glisseront le long de parois en " V " pour former un bouton globulaire bien net au centre de la cuvette : réaction notée -.

10 Si aucun " coiffage " ou sensibilisation n'a eu lieu dans " Bil " pendant l'incubation, les hématies se fixeront sur l'anticorps fixé sur " Oba " s'il est dirigé contre leurs antigènes, pour former un tapis plus ou moins homogène suivant l'intensité de la réaction (notée ++++ à +) mais ne se fixeront pas sur les anticorps non dirigés contre leurs antigènes auquel cas il formeront ici encore un bouton globulaire bien net au centre de la cuvette : réaction notée -.

15 Les réactions observées dans les quatre cuvettes de notre exemple sont donc les suivantes :

20 Les cuvettes 1 (Bil 1 / Oba 1) et 2 (Bil 2 / Oba 2) donnent une image de tapis rosé plus ou moins homogène, réaction notée de ++++ à + suivant son intensité, car les globules A n'ayant pas été sensibilisés par les anticorps anti-B présents dans le plasma du sujet A ont adhéré au sérum-test anti-A fixé sur le fond des cuvettes Oba 1 et Oba 2.

25 La cuvette 3 (Bil 3 / Oba 3) donne une image de bouton central traduisant l'inhibition d'adhérence des hématies B sensibilisées par les anticorps anti-B présents dans le plasma du sujet A et qui ne peuvent plus adhérer au sérum-test anti-B fixé sur le fond de la cuvette Oba 3.

30 La cuvette 4 (Bil 4 / Oba 4) donne une image de bouton central traduisant l'absence de réaction d'adhérence entre les hématies O (sensibilisées par aucun anticorps) et le sérum-test anti-AB fixé sur le fond de la cuvette Oba 4.

35 Les avantages de la technique de contre-épreuve BilOba® par rapport aux autres techniques de contre-épreuve sont multiples. Ils résident en une simplification de la procédure technique et une absence de phénomènes contradictoires conduisant à des interprétations des résultats parfois erronées.

40 1 – Elimination des étapes à risques entrant dans la réalisation de la contre-épreuve, telles que les étapes d'agitation qui sont difficilement standardisables.

45 Si on compare la procédure d'utilisation d'une technique en microplaque et d'une technique de phase solide (voir tableau ci-dessous), on constate que trois étapes à risques nécessaires dans la technique microplaque sont inutiles dans la technique BilOba®.

COMPARAISON DES PROCEDURE DE REALISATION
DE LA CONTRE-EPREUVE EN MICROPLAQUE ET
DE LA CONTRE-EPREUVE EN PHASE SOLIDE BilOba®.

ETAPES	CONTRE-EPREUVE EN MICROPLAQUE	CONTRE-EPREUVE EN PHASE SOLIDE	ETAPES
		Dépôt de 30 µl de milieu de dilution	1
1	Dépôt de 30 µl de sérum ou plasma à tester	Dépôt de 10 µl de sérum ou plasma à tester	2
2	Dépôt de 30 µl de suspension de globule-tests à 3%	Dépôt de 30 µl de suspension de globule-tests à 0,2%	3
3	Homogénéisation*		
		Incubation 5 minutes	4
4	Centrifugation 2 à 3 minutes 150 – 200 g	Centrifugation 4 minutes 1000 g	5
5	Agitation forte 1 minute*		
6	Agitation lente 1 minute*		
7	Lecture	Lecture	6

5 * Etapes à risques.

Dans la technique en microplaque, l'étape d'homogénéisation du mélange sérum + hématies est effectuée soit par tapotements manuels de la microplaque, soit sur agitateur vibrant.

10 Après centrifugation, des pastilles globulaires se forment au centre des cuvettes. Pour différencier les réactions positives des réactions négatives, il convient alors d'agiter plus ou moins fortement la microplaque pendant une minute pour décoller la pastille globulaire puis d'agiter la microplaque de manière douce pendant une autre minute pour collecter au centre des cuvettes, les agglutinats qui auront subsisté à l'agitation.

20 On comprend les limites de cette technologie dont les résultats peuvent varier en fonction de paramètres appliqués à sa réalisation. Une agitation trop puissante, détruisant les agglutinats faibles peut conduire à une interprétation faussement négative. Une agitation insuffisante (en temps et / ou en vitesse) ne séparant que partiellement des hématies concentrées par centrifugation peut conduire à une interprétation faussement positive.

25 Il n'existe pas d'appareil standardisé aujourd'hui, permettant de reproduire à l'identique des cycles d'agitation. Ceci pose un gros problème de reproductibilité.

30 Par ailleurs, certaines plaques de microtitration peuvent parfois présenter des phénomènes de collage spontané des hématies qui impliquent une agitation plus vigoureuse pour leur remise en suspension. Celle-ci est donc contraire à la recherche d'une grande sensibilité.

2 – Simplification de la lecture

5 Dans la technique en microplaque, la disposition des agglutinats au centre des cuvettes est importante pour la lecture automatisée, qui, en dehors de la lecture par analyse d'image plus récente et encore confidentielle, procède à une mesure de densité optique différentielle entre le centre de la cuvette et sa périphérie. Un décalage des agglutinats par rapport au centre des cuvettes peut conduire à une interprétation faussement négative.

10 3 – Meilleure sensibilité avec des hématies A₂

Dans les techniques traditionnelles en tubes ou en microplaques, des réactions faibles sont souvent constatées en particulier avec des hématies A₂, car les anticorps naturels sont souvent de titre faible et peu avides vis à vis des sites antigéniques A₂ conduisant à des associations fragiles.

15 Dans la technique BilOba® , cette faiblesse n'entre pas en ligne de compte car les hématies ne sont pas agglutinées et une sensibilisation, même partielle, se traduit immédiatement par une inhibition d'adhérence parfaitement visible.

20 4- Réduction importante de la consommation de globule-tests

Etant en dilution à 0,2%, la consommation de globule-tests est réduite par 50 fois comparativement aux techniques traditionnelles en tube, et par 4 fois par rapport aux techniques en micro-colonnes. Avec une poche de sang on peut envisager plus de trois millions de tests en technique BilOba.

REVENDEICATIONS

- 1 – Procédé de diagnostic immunologique par adhérence en cuvettes
5 caractérisé en ce que la couche sensible localisée sur le fond de chaque
cuvette est maintenue humide par un coussin hydratant et en ce que la cuvette
est fermée hermétiquement par un opercule.
- 2- procédé selon la revendication-1 caractérisé en ce que le coussin hydratant
est un complexe à base de gel de dextran du type " Sepharose " ou
10 " Sephacryl " ou équivalents et d'une solution de densité intermédiaire entre
celle du plasma et celle des globules rouges procurant un effet gradient qui
concourt à la séparation dynamique de ces éléments au cours d'une
centrifugation.
- 3- Procédé selon les revendications 1 et 2 qui autorise des réactions
15 immunologiques sans phase de lavage.
- 4- procédé selon la revendication-1 caractérisé en ce que les hématies qui
entrent en compte dans la réaction immunologique ne sont jamais agglutinées et
traversent le gel sans effet de filtration différentielle pour venir au contact du
fond des cupules.
- 20 5- procédé selon la revendication-1 caractérisé en ce que le gel constitutif du
coussin hydratant provoque un effet pressoir sur les hématies au cours de la
phase de centrifugation et lors de leur écoulement sur le fond des cupules.
Cette action pressoir amplifie les conditions de contact des dites hématies avec
la phase solide sensibilisée du fond des cupules et de ce fait augmente de façon
25 notable l'adhérence spécifique et donc la sensibilité du test.
- 6- procédé selon la revendication-1 caractérisé en ce que même les anticorps
naturels de type IgM ne provoquent pas d'agglutination spontanée et ne
donnent de ce fait pas lieu à des phénomènes de filtration différentielle lors de
leur passage au travers du coussin hydratant sous l'effet de la centrifugation.
- 30 7- procédé selon les revendications 1 et 6 caractérisé en ce qu'il autorise la
mise en évidence d'anticorps de type anti-A et anti-B par réaction d'adhérence
directe ou par réaction d'inhibition d'adhérence (test de Simonin).
- 8- Procédé selon les revendications 1, caractérisé en ce que la phase solide
peut être sensibilisée par des anticorps de différents types, sans limitation, et
35 par des antigènes.
- 9- Procédé selon la revendication-1 caractérisé en ce que la lecture de la
réaction s'effectue par l'observation du dessous de chaque cupule.