ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1011487A3

NUMERO DE DEPOT : 09700807

Classif. Internat. : G01N

Date de délivrance le : 05 Octobre 1999

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 07 Octobre 1997 à 15H55 à l 'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : UCB-BIOPRODUCTS, S.A. allée de la Recherche 60, B-1070 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : Mareschal-Haestier Anne, rue d'Anderlecht 33, B-1620 DROGENBOS (BE)

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : DISPOSITIF D'ESSAI POUR LA DETERMINATION D'ANALYTES DANS UN PRODUIT LAITIER LIQUIDE.

INVENTEUR(S) : Degelaen Jacques, avenue du Taillis 14, B-1470 Genappes (BE); Granier Benoit, quai de la Régence 33, B-4130 Esneux (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) demandeurs(s).

Bruxelles, le 05 Octobre 1999
PAR DELEGATION SPECIALE :

[illegible]
CONSEILLER

Dispositif d'essai pour la détermination d'analytes dans un produit laitier liquide.

La présente invention se rapporte à un dispositif d'essai pour la détermination d'analytes dans un produit laitier liquide tel que le lait. Elle concerne également un procédé permettant la détection et la quantification d'analytes dans le lait grâce à ce dispositif d'essai ainsi qu'une trousse d'essai comprenant ce dispositif d'essai.

A l'heure actuelle, les exigences sanitaires de nombreux pays imposent de contrôler régulièrement la présence de diverses substances dans les produits laitiers, tels que médicaments vétérinaires et hormones, couramment utilisés dans l'élevage du bétail. Pour des raisons médicales évidentes, ces substances doivent être évitées dans les produits laitiers destinés à la consommation humaine.

Dans d'autres cas, il est souhaitable de disposer de tests permettant de détecter la présence de substances endogènes dans le lait afin d'optimiser les pratiques d'élevage du bétail. En particulier, la détermination rapide du taux d'hormones dans le lait permet d'identifier facilement les périodes propices à la reproduction.

Dans d'autres cas encore, on recherche des méthodes pratiques et fiables pour contrôler l'origine des produits laitiers dérivés des laits de diverses espèces animales. On recherche alors des méthodes qui permettraient d'identifier la présence de protéines caractéristiques du lait de certaines espèces par rapport à d'autres.

Par ailleurs, divers tests sont connus dans la littérature pour la détection d'analytes dans des liquides biologiques. Ces tests utilisent généralement des méthodes de détection faisant appel à un agent de reconnaissance (récepteur ou anticorps) qui reconnaît spécifiquement l'analyte ou un analogue de cet analyte, et à un agent de marquage (radioélément, enzyme, agent fluorescent, etc.) ci-après dénommés réactifs de détection. En fonction des éléments choisis, on parlera de radioimmunoessai (RIA), de radiorécepteuressai (RRA), d'enzymeimmunoessai (EIA) etc. Dans leur principe général, ces tests font appel à la combinaison minimale des deux éléments précités (réactifs de détection) qui permettra d'obtenir un résultat dont la valeur est une indication de la quantité d'analyte présent.

Il convient de remarquer qu'en fonction de la méthode de détection choisie, l'agent de marquage peut être couplé soit à l'agent de reconnaissance soit à l'analyte ou à une substance analogue de l'analyte du point de vue de sa reconnaissance par l'agent de reconnaissance. Il existe également des procédés dans lesquels l'agent de reconnaissance ou l'analyte ou la substance analogue de l'analyte contient intrinsèquement l'agent de marquage (par exemple un analyte marqué radioactivement).

Pour les produits laitiers, les tests de détection d'analytes les plus couramment décrits concernent la détection d'antibiotiques.

Le brevet US 4.239.852 décrit un procédé microbiologique pour la détection d'antibiotiques à noyau β-lactame dans le lait. Selon ce procédé, l'échantillon de lait est incubé, d'une part, en présence de parties de cellules d'un micro-organisme très sensible aux antibiotiques, en particulier Bacillus stearothermophilus, et, d'autre part, en présence d'un antibiotique marqué par un élément radioactif ou par une enzyme. L'incubation est menée dans des conditions permettant aux antibiotiques éventuellement présents dans l'échantillon et à l'antibiotique marqué de se lier aux parties de cellules.

Après incubation, les parties de cellules sont séparées du mélange, puis lavées. Ensuite, la quantité d'antibiotique marqué lié aux parties de cellules est déterminée et comparée à un standard. La quantité d'antibiotique marqué lié aux parties de cellules est inversement proportionnelle à la concentration d'antibiotique présent dans l'échantillon de lait analysé.

Ce procédé requiert des manipulations relativement délicates, notamment lors de la séparation des parties de cellules du mélange. En outre, dans sa version la plus sensible, ce procédé utilise un antibiotique marqué par un élément radioactif (^{14}C ou ^{125}I). Dans ce cas, la détermination de la quantité d'antibiotique éventuellement présent dans le lait nécessite d'avoir recours à un appareil spécial, comme par exemple un compteur à scintillation. De plus, la manipulation de produits radioactifs, même en très faibles quantités n'est pas totalement exempte de danger pour la personne qui effectue l'analyse.

La demande de brevet européen 593.112 décrit une autre méthode permettant la détection d'antibiotiques dans le lait. Cette méthode utilise une protéine isolée à partir d'un microorganisme sensible aux antibiotiques, tel que Bacillus stearothermophilus. Cette protéine est en outre marquée par une enzyme telle qu'une peroxydase.

Le test procède de la manière suivante: un échantillon de lait est incubé dans un tube en présence de la protéine marquée; après incubation, le lait est transféré dans un second tube sur les parois duquel un antibiotique de référence a été immobilisé; on procède à une seconde incubation, puis le contenu du tube est éliminé; les parois de ce second tube sont lavées trois fois au moyen d'une solution de lavage, qui est elle-même éliminée, puis les résidus présents dans le second tube sont transférés sur un papier absorbant; on ajoute alors un substrat colorant dans le second tube qui est incubé une nouvelle fois, puis on ajoute une solution arrêtant le développement de la couleur; la coloration du tube est comparée à la coloration d'un test identique effectué parallèlement sur un échantillon standard d'antibiotique. La quantité de protéine marquée immobilisée sur le support, et donc, l'intensité de la coloration, est inversement proportionnelle à la quantité d'antibiotique présent dans l'échantillon de lait analysé.

Selon l'exemple 1 de cette demande de brevet, ce test permet de détecter la pénicilline G jusqu'à des concentrations de l'ordre de 5 ppb et permet la détection de l'amoxicilline (5 ppb), de l'ampicilline (10 ppb), de la cephapirine (5 ppb) et du ceftiofur (5 ppb).

Toutefois, le test est assez fastidieux à mettre en oeuvre, en particulier par du personnel non qualifié. En effet, ce test comporte de nombreuses étapes, y compris des étapes de transvasement de liquide et de résidus et plusieurs étapes de rinçage. Etant donné le nombre et le type d'étapes requises dans ce test, l'obtention d'un résultat fiable dépend fortement du savoir-faire expérimental de l'exécutant.

En outre, l'interprétation du résultat nécessite de faire deux tests en parallèle, ce qui multiplie et complique encore les opérations.

On connaît également d'autres types de procédés enzymatiques permettant de déterminer de faibles concentrations d'antibiotiques dans le lait (J.M. FRERE et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18(4), 506-510 (1980) ainsi que les brevets EP 85.667 et EP 468.946) qui sont basés sur l'utilisation d'une enzyme spécifique, en l'occurrence, la D-alanyl-D-alanine-carboxypeptidase exocellulaire soluble, qui est produite par Actinomadura R39 (ci-après désignée "enzyme R39"). L'enzyme R39 possède une activité spécifique d'hydrolyse des groupements D-alanyl-D-alanine de divers peptides et est également capable d'hydrolyser des thioesters particuliers.

En outre, l'enzyme R39 réagit avec les antibiotiques à noyau β-lactame pour former très rapidement un complexe enzyme-antibiotique équimolaire, inactif et sensiblement irréversible.

Dans la version la plus récente de ce test (EP 468.946), un volume déterminé d'un échantillon du liquide à examiner est incubé avec une quantité prédéterminée de l'enzyme R39 dans des conditions permettant à l'antibiotique β-lactame éventuellement présent dans l'échantillon de réagir avec l'enzyme pour former un complexe enzyme-antibiotique équimolaire, inactif et sensiblement irréversible.

Ensuite, une quantité déterminée de substrat de type thioester est incubée avec le produit obtenu au premier stade dans des conditions permettant l'hydrolyse du substrat par l'enzyme R39 résiduelle qui n'a pas été complexée avec l'antibiotique lors de la première incubation. La quantité d'acide mercaptoalcanoïque ainsi formée est alors déterminée par dosage colorimétrique à l'aide d'un réactif capable de produire une coloration par réaction avec le groupe SH libre de l'acide mercaptoalcanoïque. L'intensité de la coloration est comparée à un étalon, préalablement établi à partir d'échantillons contenant des quantités connues d'antibiotiques. La détermination quantitative peut se faire par mesure au spectrophotomètre; dans le cas du lait, la clarification préalable de l'échantillon peut s'avérer nécessaire.

Clairement, ce test comporte moins d'étapes et est plus simple à mettre en oeuvre que le test décrit dans la demande de brevet EP 593.112. Toutefois, il est limité à la détection d'antibiotiques à noyau β-lactame, et ce, jusqu'aux seuils limites de détection accessibles avec l'enzyme R39. Tel quel, ce test ne peut pas être utilisé avec d'autres récepteurs d'antibiotiques, et ne peut pas directement servir de base pour la détection d'autres analytes dans le lait.

Puisque les tests actuels présentent encore divers inconvénients, la demanderesse s'est fixé comme objectif de rechercher de nouvelles méthodes pour la détection d'analytes dans les produits laitiers liquides, les méthodes recherchées devant permettre la détermination fiable de différents types d'analytes, de préférence au moment de la collecte à la ferme. La demanderesse a donc recherché une méthode qui permette très rapidement d'obtenir un résultat fiable en un nombre limité d'étapes simples, ne requérant pas de savoir-faire expérimental particulier. En outre, la demanderesse a recherché une méthode fournissant un résultat facilement détectable visuellement et pouvant en outre faire l'objet d'une quantification par mesure instrumentale.

La demanderesse vient maintenant de découvrir que ces objectifs peuvent être atteints grâce à l'utilisation d'un nouveau dispositif d'essai permettant de déterminer aisément la présence d'analytes dans les produits laitiers liquides, en particulier, le lait.

C'est pourquoi la présente invention concerne un dispositif d'essai permettant de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide par migration capillaire dudit produit laitier. Le dispositif d'essai selon l'invention comprend un support solide (1) qui possède une première et une seconde extrémité, sur lequel sont fixées, successivement, en partant de la première extrémité,

- une membrane (2) permettant la purification du liquide analysé,
- une membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture sont immobilisées, et
- une membrane (4) absorbante.

Selon un mode d'implémentation particulier de l'invention, le dispositif d'essai selon la présente invention possède en outre une membrane (5) sur laquelle au moins un réactif de détection a été déposé, ce réactif de détection étant capable de se solubiliser rapidement en présence dudit produit laitier. Selon ce mode d'implémentation particulier, la membrane (5) doit être située avant la membrane (3). Elle peut être située, par exemple, soit avant la membrane (2) à la première extrémité du dispositif, soit entre la membrane (2) et la membrane (3) ou encore en dessous ou au dessus de la membrane (2).

Les différentes membranes présentes dans le dispositif d'essai selon la présente invention se superposent à leurs extrémités de manière à assurer la migration continue du produit laitier d'une zone à l'autre. De préférence, la membrane (3) est placée de manière à ce que son extrémité proximale soit placée en dessous de la membrane (2) et son extrémité distale en dessous de la membrane (4). Les membranes peuvent éventuellement être maintenues en contact les unes avec les autres grâce à un film plastique adhésif (6). Dans ce cas, le film plastique adhésif est choisi de manière à ne pas affecter la migration du liquide sur le dispositif d'essai.

L'option de couvrir le dispositif d'essai par un film plastique adhésif présente deux avantages: il assure un contact parfait à la superposition des membranes et constitue un film protecteur. Le film plastique adhésif (6) peut soit recouvrir complètement les membranes (2), (3), (4) et (5), soit recouvrir partiellement les membranes individuelles. De préférence, le film plastique adhésif (6) ne recouvre pas les premiers millimètres de la première extrémité de manière à permettre une migration plus rapide du liquide sur la membrane (2) du dispositif d'essai.

Les Figures 1 à 3 illustrent des exemples de dispositifs d'essai selon la présente invention. Les Figures 1a, 2 et 3 présentent des vues frontales et la Figure 1b présente une vue en section longitudinale.

Le support solide (1) présent dans le dispositif d'essai selon la présente invention est en verre ou en matière plastique, de préférence, en matière plastique. Dans le cas d'un support en matière plastique, son épaisseur est généralement comprise entre 0,05 et 1 mm, de préférence entre 0,1 et 0,6 mm. Les membranes sont fixées sur le support solide (1) grâce à un adhésif.

La membrane (2) peut être de différents types, pour autant qu'elle soit capable de retenir les substances présentes dans le produit laitier qui empêchent la migration sur le dispositif d'essai des analytes éventuellement présents dans le produit laitier et des réactifs de détection utilisés selon la méthode pratiquée. Toutefois, la membrane (2) ne doit pas empêcher la migration des analytes et réactifs de détection, et doit préserver leurs activités lors de cette migration. Des exemples non limitatifs de membranes permettant d'obtenir ce résultat selon l'invention sont: Cytosep, Leukosorb ou Loprosorb (disponibles chez Pall Gelman Sciences), Primecare (disponible chez Primecare, n.v) ou Rayon Non-woven 5S (disponible chez Schleicher & Schuell), de préférence, Leukosorb.

Quant à sa dimension, la membrane (2) doit être suffisamment longue pour permettre l'élimination de toutes les substances présentes dans le produit laitier qui empêchent la migration des analytes et réactifs de détection sur le dispositif d'essai.

La membrane (3) doit permettre d'immobiliser une ou plusieurs substances de capture et doit permettre la migration d'un flux de liquide approprié pour le type

d'application visé ici.. De préférence, la membrane (3) est consolidée sur un support non poreux de type polyester. Des exemples non limitatifs de membranes convenant selon la présente invention sont: les membranes en nitrocellulose à haute porosité telles que les membranes Hi-Flow (disponibles chez Millipore), les membranes en nitrocellulose de type AE100-12µm, AE99-8µm, AE-S110 (disponibles chez Scleicher & Schuell), les membranes de nitrocellulose de 5,0 µm et 8,0 µm (disponibles chez Whatman), les membranes Biodyne, immunodyne, loprodyne (disponibles chez Pall Gelman Sciences), les membranes Immunopore Lateral Flow (disponibles chez Corning Costar Corporation), la membrane de nitrocellulose CNPF 10 (disponible chez Adanced Micro Devices)ou encore la membrane en nylon LPNPG CG 3R (disponible chez Pall Gelman Sciences). De préférence, on utilise une membrane Hi-Flow (Millipore).

Une ou plusieurs substances de capture sont immobilisées sur la membrane (3). Le type de substance de capture immobilisée dépend bien entendu de la méthode pratiquée pour la détection des analytes; les substances de capture sont capables d'immobiliser sélectivement au moins un des constituants présents dans le liquide migrant sur le dispositif d'essai, tel que l'un des réactifs de détection ou le produit résultant de la formation d'un complexe entre l'analyte ou une substance analogue de cet analyte et au moins un réactif de détection ou encore, le produit résultant de la formation d'un complexe entre plusieurs réactifs de détection. La substance de capture peut aussi être un des réactifs de détection. Les substances de capture sont placées de manière concentrée sur une portion ou plusieurs portions bien délimitées de la membrane (3), telles que des disques ou des bandes minces, ou tout autre motif approprié pour l'application. Quel que soit le motif choisi, il doit permettre d'obtenir une lecture claire du résultat.

Quant à sa dimension, la membrane (3) doit être d'une longueur suffisante pour contenir toutes les substances de capture utilisées, et ce, dans l'ordre et dans les quantités requises selon la méthode de détection pratiquée.

Le type de membrane utilisé pour la membrane (4) importe peu, pour autant que celle-ci soit capable d'absorber et stocker le liquide après son passage sur les membranes précédentes. La membrane (4) est de dimension suffisamment grande pour permettre d'absorber le liquide après son passage sur la membrane (3), mais aussi, d'un point de vue pratique, pour permettre une prise manuelle plus aisée du dispositif d'essai.

Eventuellement, le dispositif d'essai selon la présente invention peut comprendre une membrane (5) sur laquelle au moins un réactif de détection a été déposé. La membrane (5) doit permettre la migration du produit laitier, tout en permettant la solubilisation et le relargage du (ou des) réactif(s) de détection lors du passage du flux de produit laitier. Des exemples non limitatifs de membranes pouvant

convenir à cet effet sont: les membranes à base de résines en fibre de verre telles que les membranes T5NM (disponibles chez Millipore), les membranes F075-14 ou F075-17 ou GF/C (disponibles chez Whatman) la membrane Cytosep 1663 (disponible chez Pall Gelman Sciences), les membranes à base de résines en fibres de polyester telles que les membranes Accuwick (disponible ches Pall Gelman Sciences) ou encore le papier cellulosique 3 mm (disponibles chez Whatman). De préférence, on utilise une membrane à base de résines en fibres de polyester telle que les membranes Accuwick. La membrane (5) a une longueur suffisante pour supporter la quantité de réactif de détection désirée.

Les dispositifs d'essai selon la présente invention sont fabriqués par les méthodes connues de l'homme du métier. On peut par exemple préparer des cartes grâce a des laminateurs disponibles dans le commerce. Les substances de capture utilisées sont déposées sur la membrane (3) sous la forme de solutions, avant ou après l'assemblage des cartes. Le dépôt de ces solutions peut être réalisé de manière très précise grâce à des appareillages disponibles dans le commerce, tel que le Dispenser X-Y Platform Biojet Quanti-3000 de Bio Dot, Inc. Ces solutions déposées sont aussitôt évaporées, par exemple, en plaçant la carte sous un flux d'air chaud. Pour la production à grande échelle, on peut également préparer des rouleaux. Ensuite, les cartes et rouleaux portant les substances de capture désirées sont découpées en lamelles, chacune de ces lamelles constituant un dispositif d'essai selon l'invention.

Lorsque le dispositif d'essai comprend une membrane (5), le(s) réactif(s) de détection peut(vent) y être déposé(s) avant l'assemblage des cartes ou rouleaux, par simple immersion de la membrane (5) dans une solution contenant le(s) réactif(s) de détection. Alternativement, il peut(vent) être déposé(s) après assemblage des cartes ou rouleaux par une technique analogue à celle utilisée pour le dépôt des substances de capture sur la membrane (3).

Dans une variante de l'invention, le dispositif est placé dans un boîtier plastique qui présente deux ouvertures: la première, en forme de cuvette, est placée juste au-dessus de la membrane (2), et permet de recevoir le liquide à analyser; la seconde est une fenêtre d'ouverture permettant de visualiser le résultat sur la membrane (3). Dans ce cas, le dispositif d'essai ne comprend pas de film plastique adhésif (6).

Le dispositif d'essai selon la présente invention permet de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide, en particulier le lait.

C'est pourquoi la présente invention concerne également un procédé pour la détection d'analytes dans un produit laitier liquide, utilisant un dispositif d'essai selon la présente invention ainsi que des réactifs de détection, comprenant les étapes suivantes:

a) la mise en contact d'un volume déterminé de produit laitier avec le dispositif d'essai selon la présente invention, cette mise en contact ayant lieu à la première extrémité du dispositif d'essai,

b) la migration par capillarité du produit laitier sur le dispositif d'essai de manière à ce que les analytes et les réactifs de détection éventuellement présents dans le produit laitier passent progressivement sur la membrane (2), puis la membrane (3), et de manière à ce que les constituants du produit laitier qui ne sont pas arrêtés par les membranes (2) et (3) aboutissent dans la membrane (4), et

c) la détermination d'une fixation sur la membrane (3).

Le procédé selon la présente invention permet de détecter des analytes dans un produit laitier liquide, par exemple du lait, du petit lait, du lait battu, ... La présente invention s'adresse plus particulièrement à la détection d'analytes tels que médicaments vétérinaires, hormones ou protéines susceptibles d'être présents dans le lait.

Les réactifs de détection utilisés selon le procédé de l'invention peuvent varier en nombre et en nature en fonction du mode d'implémentation de l'invention, lui-même basé sur la méthode de détection pratiquée. Le procédé selon l'invention utilise au moins deux réactifs de détection. Le premier réactif de détection est un agent de reconnaissance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte, et sera ci-après dénommé "Identifiant". Le second réactif de détection est un agent de marquage, et sera ci-après dénommé "Marqueur". Il convient de remarquer qu'en fonction du mode d'implémentation choisi, certains réactifs de détection peuvent être présents sur la membrane (3) ou sur la membrane (5). En fonction de l'analyte à détecter et des réactifs de détection utilisés, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter un ou plusieurs réactifs de détection avant l'étape de mise en contact du produit laitier avec le dispositif d'essai selon l'invention et de maintenir ce mélange dans des conditions d'incubation permettant la formation d'un complexe entre des réactifs de détection et l'analyte ou une substance analogue de l'analyte. En fonction de la méthode choisie, l'Identifiant et le Marqueur peuvent être couplés entre eux ou peuvent n'être qu'une seule et même substance. D'autre part, il peut y avoir plusieurs Identifiants et/ou Marqueurs.

L'Identifiant permet de détecter la présence du type d'analyte recherché grâce à sa capacité à reconnaître spécifiquement cet analyte ou une substance analogue de cet analyte. Il peut s'agir d'un récepteur capable de former sélectivement un complexe stable et essentiellement irréversible avec l'analyte ou une substance analogue de l'analyte ou d'un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de l'analyte ou d'une substance analogue de l'analyte. Pour la détection d'antibiotiques, l'Identifiant peut être choisi parmi des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques ou parmi les

récepteurs obtenus à partir de microorganismes sensibles aux antibiotiques, tels que les récepteurs obtenus à partir des espèces Bacillus (Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, ...) Streptococcus (Streptococcus thermophilus, ...), Actinomycètes (Actinomadura R39, ...).

Le second type de réactif de détection utilisé est un Marqueur qui permet de visualiser et de quantifier directement ou indirectement la présence des analytes dans le produit laitier. Les Marqueurs utilisables selon l'invention peuvent être particulaires, fluorescents, radioactifs, luminescents ou enzymatiques. On choisit de préférence un Marqueur particulaire qui fournit un signal visuel aisément détectable, même lorsque celui-ci est présent en faible quantité. A titre d'exemples non limitatifs, on citera les particules colloïdales métalliques (platine, or, argent, etc.), les particules colloïdales de sélénium, carbone, soufre, tellure ou encore les particules colloïdales de latex synthétiques colorés. Les particules d'or colloïdal ayant un diamètre particulaire compris entre 1 et 60 nm sont particulièrement préférées: elles fournissent une coloration rose-rouge intense aisément détectable.

Le Marqueur permet de déterminer la présence de l'analyte dans l'échantillon de produit laitier grâce à son couplage à un ou plusieurs réactifs de détection, à l'analyte ou à une substance analogue de l'analyte.

Le couplage entre le Marqueur et le réactif de détection peut être réalisé selon les méthodes connues de l'homme du métier. Lorsqu'on utilise un Marqueur particulaire, le marquage peut avoir lieu soit par adsorption directe sur les particules, soit indirectement, par le biais d'un bras d'ancrage chimique, tel qu'un complexe biotine/anti-biotine, par exemple. Ce couplage peut avoir lieu, soit avant l'étape de mise en contact du produit laitier avec le dispositif d'essai selon l'invention, soit pendant la migration du produit laitier sur le dispositif d'essai selon l'invention.

Selon un mode d'implémentation particulier de l'invention, on utilise un troisième type de réactif de détection, ci-après dénommé "Référence". Il s'agit d'une substance ajoutée en quantité connue à l'échantillon analysé, et qui se fixe sur une substance de capture spécifique immobilisée sur la membrane (3). La Référence fournit une bande dont l'intensité sert de référence pour la quantification de l'analyte.

En ce qui concerne la mise en contact du produit laitier avec le dispositif d'essai selon l'invention (étape a) du procédé), elle est réalisée en plaçant le dispositif d'essai selon la présente invention dans un récipient au fond duquel se trouve l'échantillon à analyser. Le dispositif d'essai est placé essentiellement verticalement dans le récipient, de manière à ce que la première extrémité du dispositif soit en contact avec le mélange.

Dans la variante de l'invention utilisant un dispositif d'essai placé dans un boîtier plastique, celui-ci est disposé horizontalement et la mise en contact s'effectue

en déposant un aliquot d'échantillon à analyser dans l'ouverture en forme de cuvette placée au-dessus de la membrane (2).

Pour l'étape de migration b), on laisse migrer le liquide par capillarité sur le dispositif d'essai selon l'invention. Le liquide qui migre par capillarité sur le dispositif d'essai selon l'invention rencontre tout d'abord la membrane (2) qui permet de retenir les substances présentes dans le produit laitier qui empêchent la migration des analytes éventuellement présents dans le produit laitier et réactifs de détection sur le dispositif d'essai. Les analytes et les réactifs de détection migrent ensuite sur la membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture ont été immobilisées. Les substances de capture immobilisent sélectivement au moins un des constituants présents dans le liquide analysé. Selon un mode d'implémentation particulier de l'invention, on utilise une substance de capture placée en fin de parcours de migration du liquide sur la membrane (3) qui est capable de fixer tous les Marqueurs qui n'ont pas été arrêtés par les substances de capture précédentes. Cette substance de capture permet de compléter les informations quantitatives fournies par les substances de capture précédentes.

La détermination d'une fixation sur la membrane (3) (étape c) du procédé) s'effectue simplement en déterminant la présence de Marqueurs dans cette zone. Cette détermination est possible simplement visuellement. Toutefois, si l'on désire avoir une mesure précise de l'intensité des signaux observés, on peut avoir recours à un appareil capable de mesurer l'intensité du signal observé. Lorsqu'on utilise une Référence, elle est fixée par une substance de capture spécifique qui fournit une référence interne pour la mesure de l'intensité des signaux observés.

L'interprétation du résultat obtenu dépend de la méthode de détection pratiquée, à savoir, des réactifs de détection et substances de capture utilisées.

Par rapport aux procédés de détection d'analytes dans le lait précédemment décrits dans la littérature, le procédé selon la présente invention présente les avantages suivants. En premier lieu, ce procédé est très rapide et extrêmement simple à mettre en oeuvre: il comporte essentiellement deux étapes de manipulation aisée, ne requérant pas de savoir-faire expérimental particulier. Ensuite, l'appréciation qualitative et quantitative du résultat est immédiate et ne nécessite pas d'opérations supplémentaires particulières, telles que celles requises lorsque la détection est effectuée par des colorants et/ou marqueurs enzymatiques. En outre, ce procédé est directement applicable pour la détection de différents types d'analytes. Enfin, dans le mode d'implémentation utilisant une Référence, le résultat est directement interprétable et quantifiable, sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à un ou plusieurs tests de référence.

La présente invention concerne aussi une trousse d'essai pour la détection d'analytes dans un produit laitier comprenant un dispositif d'essai selon la présente invention. Le cas échéant, la trousse d'essai selon la présente invention peut également contenir les réactifs de détection à ajouter à l'échantillon avant la mise en contact du produit laitier avec le dispositif d'essai.

Les exemples qui suivent illustrent différents aspects et modes d'implémentation de la présente invention sans toutefois en limiter sa portée.

Exemple 1. Fabrication des dispositifs d'essai. Modes opératoires généraux.

1.1. Assemblage de cartes membranaires.

Des cartes ayant une taille de 300 x 76,2 mm sont d'abord assemblées au moyen d'un laminateur de type Chlamshell Laminator (disponible chez Bio Dot, Inc.) selon la méthode suivante:

On découpe un rectangle de support plastique de type ArCare 8565 (disponible chez Adhesive Research) de dimension 300 x 76,2 mm (support solide (1)). On découpe ensuite un rectangle de membrane Leukosorb LK4 (disponible chez Pall Gelman Sciences) de dimension 300 x 20 mm (membrane (2)), un rectangle de membrane Hi-Flow SX (disponible chez Millipore) de dimension 300 x 25 mm (membrane (3)), un rectangle de membrane de cellulose 3 mm (disponible chez Whatmann) de dimension 300 x 40 mm (membrane (4)) et un rectangle de membrane Accuwick (disponible chez Pall Gelman Sciences) de dimension 300 x 0,8 mm (membrane (5)).

On loge successivement les membranes (2) et (4), puis (5), puis (3) dans un emplacement spécifique du moule inférieur du laminateur. Le support solide (1) recouvert d'adhésif est quant à lui maintenu dans le couvercle de l'appareil, le côté adhésif étant exposé à l'air. Les membranes logées dans le moule inférieur sont mises en contact avec le support adhésif en refermant le laminateur; les membranes sont maintenues exactement en place au moyen d'une succion d'air réalisée par une pompe à vide. Lorsque le vide est rompu, on récupère une carte constituée du support solide (1) sur lequel les membranes (2), (3), (4) et (5) sont fixées.

1.2. Dépôt des substances de capture sur la membrane (3).

Le dépôt des substances de capture sur la membrane (3) est effectué avant ou après l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On prépare une solution aqueuse contenant la substance de capture. Elle est déposée sur la membrane (3) de la carte membranaire préparée à l'exemple 1.1. au moyen d'un "Dispenser" de type X-Y Platform Biojet Quanti-3000 de Bio Dot, Inc.

Les solutions déposées sont immédiatement évaporées en plaçant l'ensemble de la carte pendant une minute sous un air pulsé chaud à 60°C.

1.3. Dépôt de la substance de marquage sur la membrane (5).

a) Avant l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On prépare une solution aqueuse contenant la substance de marquage. La membrane (5) est immergée dans cette solution. Elle est ensuite égouttée, puis séchée une nuit à température ambiante sous un vide de 0,5 bar.

b) Après l'assemblage selon l'exemple 1.1.

On procède selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.2. pour le dépôt des substances de capture.

1.4. Dépôt du film plastique adhésif (6).

On découpe un rectangle de film adhésif du type ArCare 7759 (disponible chez Adhesive Research) de dimension 300 x 20 mm pour un recouvrement partiel, et 300 x 71,2 mm pour un recouvrement de toutes les membranes.

La carte obtenue selon l'exemple 1.1. est placée dans le moule inférieur d'un laminateur et le film adhésif est placé dans le couvercle du laminateur, le côté adhésif étant exposé à l'air. Le film plastique adhésif est mis en contact avec la carte membranaire lors de la fermeture de l'appareil.

1.5. Découpe en lamelles.

Les cartes obtenues après assemblage sont découpés en lamelles à l'aide d'un appareil de type guillotine ou à l'aide d'un appareil rotatif (disponible chez Bio Dot, Kinematic ou Akzo). Les lamelles des extrémités sont écartées, les autres lamelles étant prêtes à l'emploi.

Pour leur conservation, les dispositifs d'essai sont placés dans un récipient opaque et hermétique en présence d'un agent dessicant (Silgelac, France).

1.6. Présentation dans un carter plastique.

On place le dispositif d'essai dans un boîtier plastique qui présente deux ouvertures: la première, en forme de cuvette, est placée juste au-dessus de la membrane (2), et permet de recevoir le liquide à analyser; la seconde est une fenêtre d'ouverture permettant de visualiser le résultat sur la membrane (3).

Exemple 2. Détection d'antibiotiques dans le lait.

2.1. Identifiant.

L'identifiant utilisé dans cet exemple est La D-alanyl-D-alanine-carboxypeptidase exocellulaire soluble produite par Actinomadura R39 obtenue selon le mode opératoire décrit dans J.-M. FRERE et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18(4), 506-510 (1980).

2.2. Couplage de l'Identifiant au Marqueur.

2.2.1. Biotinylation de l'Identifiant.

250 µl d'une solution aqueuse d'enzyme R39 à 1 mg/ml sont dialysés pendant 24 heures contre 500 ml de tampon HNM (Hepes 10 mM, pH 8, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM). On ajoute alors à cette solution d'enzyme R39 dialysée, 2 ml de tampon bicarbonate (0,1 M en bicarbonate de sodium, pH 9) et 250 µl d'une solution d'ester 6-(biotinamido)caproïque de N-hydroxy-succinimide à 5 mg/ml dans de la DMF anhydre. Cette solution est agitée doucement sur agitateur pour tubes sur axe rotatif de type LABINCO (disponible chez VEL, Belgique) à une vitesse de 2 tours/minute pendant 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution ainsi obtenue est dialysée contre du tampon HNM (Hepes 100 mM; pH 8, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM) pendant 24 heures. De cette manière, on obtient une solution d'enzyme R39 biotinylée que l'on dilue dans du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM; pH 8, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 250 mM, BSA 10 mg/ml) jusqu'à une concentration de 100 µg d'enzyme R39 par ml de tampon. Cette solution est stockée à -20°C.

2.2.2. Marqueur.

Comme Marqueur, on utilise des particules d'or ayant un diamètre de 40 nm, sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-biotine a été déposé sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de l'azoture de sodium à 0,1% (disponible chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAB40). La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 10 et la concentration en protéine est d'environ 24 µg/ml.

2.2.3. Couplage de l'Identifiant biotinylé au Marqueur.

Solution A pour test rapide

La solution d'enzyme R39 biotinylée préparée à l'exemple 2.2.1. est diluée 25 fois par du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 250 mM, BSA 10 mg/ml). On mélange à température ambiante 17,5 parties en volume de cette solution diluée d'enzyme R39 biotinylée, 9,27 parties en volume de suspension de

particules d'or servant à marquer l'enzyme R39 et 6 parties en volume de suspension de particules d'or de référence (voir exemple 2.3).

Solution B pour test sensible

La solution d'enzyme R39 biotinylée préparée à l'exemple 2.2.1. est diluée 50 fois par du tampon HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 250 mM, BSA 10 mg/ml). On mélange à température ambiante 17,5 parties en volume de cette solution diluée d'enzyme R39 biotinylée, 9,27 parties en volume de suspension de particules d'or servant à marquer l'enzyme R39 et 6 parties en volume de suspension de particules d'or de référence (voir exemple 2.3).

2.3. Référence

Comme Référence, on utilise des particules d'or de 40 nm sur lesquelles un anticorps de chèvre anti-Immunoglobuline de lapin a été déposé. Ces particules sont disponibles chez BRITISH BIOCELL (Réf. GAR40), sous la forme de suspensions dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium à 2 mM à pH 7,2, stabilisée par de l'azoture de sodium à 0,1%. La densité optique de ces suspensions à 520 nm est d'environ 3 et la concentration en protéine est d'environ 6 µg/ml.

2.4. Substances de capture.

2.4.1. Première substance de capture.

8 ml d'une solution contenant 213 mg de Gamma Globuline Humaine (G4386, Sigma) et 8,6 mg de chlorhydrate de 2-Iminothiolane (Aldrich, 33056-6) dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

Par ailleurs, 20 ml d'une solution contenant 119,8 mg de céphalosporine-C et 54 mg de sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (sSMCC, 22322 Pierce)dans du tampon carbonate de sodium (100 mM, pH9) sont incubés pendant une heure à 25°C.

Les deux solutions préparées précédemment sont ensuite mélangées. On ajuste le pH de la solution résultante à 7,1 par ajout de 3 ml NaH_2PO_4 500 mM et l'on incube pendant deux heures à 25°C. Le mélange obtenu après incubation est dialysé trois fois contre 1 litre de tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7,5). La solution résultante est filtrée sur un filtre à 0,22 µm, puis elle est aliquotée et congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

Lors de l'utilisation, les aliquots sont décongelés, et on y ajoute un colorant alimentaire avant d'effectuer le dépôt sur la membrane afin d'apprécier à tout moment la position exacte du dépôt et la qualité du trait.

La première substance de capture permet de fixer les Identifiants couplés aux Marqueurs libres excédentaires par rapport à la quantité d'antibiotique présent dans l'échantillon.

2.4.2. Deuxième substance de capture.

Pour la deuxième substance de capture, on utilise une solution d'immunoglobuline de lapin (Sigma I 5006) à une concentration de 0,5 mg/ml en immunoglobuline dans du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,5, gamma globuline humaine 5 mg/ml. Cette seconde substance de capture arrête la Référence lors de la migration du liquide sur le dispositif d'essai.

2.5. Dispositif d'essai.

On utilise des dispositifs d'essai contenant les membranes (2), (3) et (4), assemblés selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.1. La membrane (3) de ces dispositifs porte du côté proximal la substance de capture décrite à l'exemple 2.4.1. et du côté distal la substance de capture décrite à l'exemple 2.4.2. Les substances de capture ont été déposées selon le procédé décrit à l'exemple 1.2.

2.5.1. Test 1 - Test rapide

On prépare sept échantillons de lait contenant respectivement 0; 2; 4; 5; 6; 8 et 10 ppb de pénicilline G. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 µl d'échantillon de lait et 32,8 µl de solution A préparée à l'exemple 2.2.3. que l'on place dans un tube Eppendorf. Ce mélange est incubé pendant 3 minutes à 47°C. On place ensuite un dispositif d'essai verticalement dans le tube Eppendorf de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 1 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 7 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande de détection est inversement proportionnelle à la quantité de pénicilline G présente dans l'échantillon.

Tableau 1

Pénicilline G (ppb)	Intensité 1ère bande	Intensité 2ème bande
0	10	6
2	8	6
4	5	6
5	3	6
6	2	6
8	1	6
10	0	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 1 montrent que ce test permet de détecter en 5 minutes jusqu'à 4 ppb de pénicilline G dans un échantillon de lait.

2.5.2. Test 2 - Test sensible.

On prépare six échantillons de lait contenant respectivement 0; 2; 2,5; 3; 4 et 5 ppb de pénicilline G. Chacune de ces solutions est alors analysée de la manière suivante.

On prélève un aliquot de 200 µl d'échantillon de lait et 32,8 µl de solution B préparée à l'exemple 2.2.3. que l'on place dans un tube Eppendorf. Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 47°C. On place ensuite un dispositif d'essai verticalement dans le tube Eppendorf de manière à ce que la première extrémité du dispositif d'essai soit en contact avec le mélange. On laisse migrer le mélange sur le dispositif d'essai tout en incubant l'ensemble pendant 2 minutes à 47°C.

Le Tableau 2 ci-dessous reprend les résultats obtenus pour les 7 échantillons testés. Une valeur d'intensité allant de 0 à 10 est attribuée aux bandes détectées, la valeur 10 étant donnée pour la bande la plus intense et la valeur 0 étant donnée pour la bande la moins intense. Selon cette échelle, on attribue une valeur 6 à la bande de référence. L'intensité du signal observé dans la première bande de détection est inversement proportionnelle à la quantité de pénicilline G présente dans l'échantillon.

Tableau 2

Pénicilline G	Intensité	
(ppb)	1ère bande	2ème bande
0	10	6
2	7	6
2,5	5	6
3	4	6
4	1	6
5	0	6

Dans cet exemple, lorsque la première bande a une intensité inférieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme positif. Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent que ce test permet de détecter en 7 minutes jusqu'à 2,5 ppb de pénicilline G dans un échantillon de lait.

Exemple 3. Utilisation d'un dispositif d'essai dans un carter plastique.

On utilise un dispositif d'essai tel que décrit à l'exemple 1.6. Dans ce cas, la mise en contact de l'échantillon avec le dispositif d'essai s'effectue en déposant le mélange incubé dans l'ouverture en forme de cuvette prévue à cet effet.

REVENDICATIONS

1. Dispositif d'essai permettant de détecter la présence d'analytes dans un produit laitier liquide par migration capillaire dudit produit laitier, comprenant un support solide (1) qui possède une première et une seconde extrémité, sur lequel sont fixées, successivement, en partant de la première extrémité,
   - une membrane (2) permettant la purification du liquide analysé,
   - une membrane (3) sur laquelle une ou plusieurs substances de capture sont immobilisées, et
   - une membrane (4) absorbante.

2. Dispositif d'essai selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il possède en outre une membrane (5) sur laquelle au moins un réactif de détection a été déposé, la membrane (5) étant située avant la membrane (3).

3. Dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les membranes sont recouvertes complètement ou partiellement par un film plastique adhésif (6).

4. Dispositif d'essai selon la revendication 3, caractérisé en ce que le film plastique (6) ne recouvre pas les premiers millimètres du dispositif d'essai.

5. Dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est placé dans un boîtier plastique présentant une ouverture en forme de cuvette au-dessus de la membrane (2) et une fenêtre d'ouverture au-dessus de la membrane (3).

6. Procédé pour la détection d'analytes dans un produit laitier liquide, utilisant un dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ainsi que des réactifs de détection, comprenant les étapes suivantes:
   a) la mise en contact d'un volume déterminé de produit laitier avec le dispositif d'essai selon la présente invention, cette mise en contact ayant lieu à la première extrémité du dispositif d'essai,
   b) la migration par capillarité du produit laitier sur le dispositif d'essai de manière à ce que les analytes et les réactifs de détection éventuellement présents dans le produit laitier passent progressivement sur la membrane (2), puis la membrane (3), et de manière à ce que les constituants du produit laitier qui ne sont pas arrêtés par les membranes (2) et (3) aboutissent dans la membrane (4), et

c) la détermination d'une fixation sur la membrane (3).

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les réactifs de détection comprennent au moins une substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de cet analyte et au moins un agent de marquage.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'au moins une substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de cet analyte est couplée à au moins un agent de marquage.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la substance capable de reconnaître spécifiquement l'analyte ou une substance analogue de l'analyte est choisie parmi les récepteurs capables de former un complexe stable et essentiellement irréversible avec l'analyte ou une substance analogue de l'analyte et les anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'analyte ou d'une substance analogue de l'analyte.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que l'agent de marquage est fluorescent, particulaire, radioactif, luminescent ou enzymatique.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'au moins un réactif de détection est ajouté avant l'étape a).

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le mélange préparé avant l'étape a) est maintenu dans des conditions d'incubation permettant à l'un des réactifs de détection de former un complexe stable et essentiellement irréversible avec l'analyte ou une substance analogue de cet analyte.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé en ce que les réactifs de détection comprennent en outre au moins une substance de référence.

14. Procédé de préparation d'un dispositif d'essai selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on prépare des cartes à partir du support solide (1) recouvert d'un adhésif et des membranes au moyen d'un laminateur, que l'on dépose les solutions de capture sur la membrane (3), puis

que l'on découpe les cartes en lamelles, chacune de ces lamelles constituant un dispositif d'essai.

15. Trousse d'essai comprenant un dispositif d'essai selon les revendications 1 à 5.

Figure 1

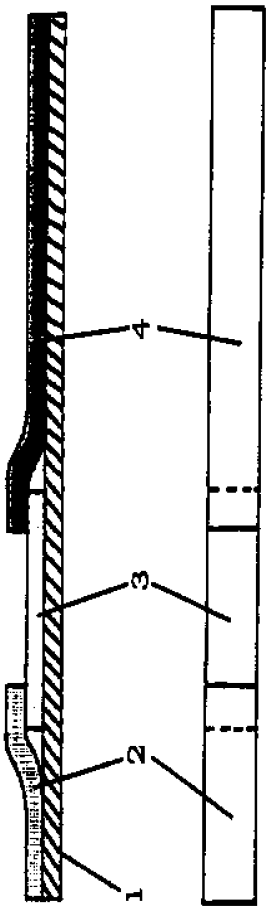


Fig. 1a

Fig. 1b

Figure 2

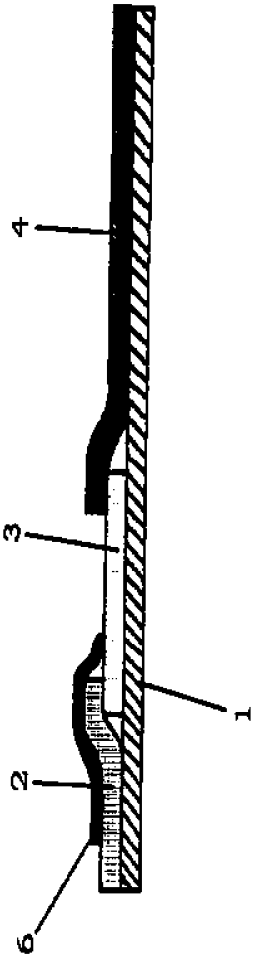
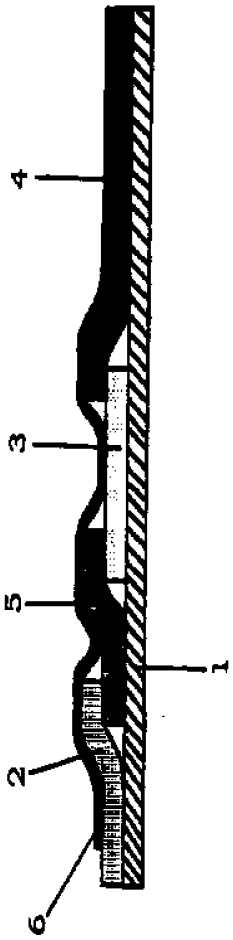


Figure 3



Numero de la demande nationale

Office européen des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2 de la loi belge sur les brevets d'invention du 28 mars 1984

BO 6793
BE 9700807

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
E	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12 novembre 1997 * revendications 1,8-12,15,16 * * colonne 2, ligne 13 - ligne 53 * * figures 5-7 * ---	1-15	G01N33/558 G01N33/543
X	EP 0 408 222 A (KINGSTON DIAGNOSTICS LP) 16 janvier 1991 * revendications * * colonne 4, ligne 37 - colonne 5, ligne 26 * ---	1-15	
X	WO 96 15453 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 23 mai 1996 * revendications * * page 4, alinéa 2 - alinéa 3 * * page 5, alinéa 4 - page 7, alinéa 2 * ---	1-15	
X	WO 96 10177 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 4 avril 1996 * revendications * * page 3, ligne 18 - page 4, ligne 6 * * figure 1 * ---	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) G01N
X	WO 93 18398 A (QUIDEL CORP) 16 septembre 1993 * revendications * * figure 1 * * page 3, ligne 11 - ligne 28 * ---	1-15	
X	US 5 591 645 A (ROSENSTEIN ROBERT W) 7 janvier 1997 * revendications * * colonne 3, ligne 51 - ligne 59 * * figure 1 * --- -/--	1-15	

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 juin 1998	Routledge, B

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

Numero de la demande nationale

Office européen des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2 de la loi belge sur les brevets d'invention du 28 mars 1984

BO 6793
BE 9700807

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	US 5 160 486 A (SCHLIPFENBACHER REINER ET AL) 3 novembre 1992 * revendications * * colonne 7, ligne 15 - colonne 8, ligne 50 * * figure 2 * -----	1-15	

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 juin 1998	Routledge, B

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 [P04C48]

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BO 6793
BE 9700807

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets citées dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

23-06-1998

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0806666 A	12-11-1997	JP 10010125 A	16-01-1998
EP 0408222 A	16-01-1991	CA 2020029 A	13-01-1991
		JP 3130662 A	04-06-1991
		JP 3130663 A	04-06-1991
WO 9615453 A	23-05-1996	AU 3752595 A	06-06-1996
WO 9610177 A	04-04-1996	AU 3483495 A	19-04-1996
WO 9318398 A	16-09-1993	EP 0630475 A	28-12-1994
		JP 7504747 T	25-05-1995
US 5591645 A	07-01-1997	AT 123575 T	15-06-1995
		AU 605565 B	17-01-1991
		AU 1359588 A	29-09-1988
		CA 1303983 A	23-06-1992
		DE 3853927 D	13-07-1995
		DE 3853927 T	16-11-1995
		DK 168188 A	28-09-1988
		EP 0284232 A	28-09-1988
		ES 2074994 T	01-10-1995
		FI 880764 A,B	28-09-1988
		GR 3017177 T	30-11-1995
		JP 1063865 A	09-03-1989
		JP 7013640 B	15-02-1995
		JP 10073592 A	17-03-1998
US 5160486 A	03-11-1992	DE 3842702 A	21-06-1990
		AU 616328 B	24-10-1991
		AU 4616889 A	21-06-1990
		CA 2005564 A	19-06-1990
		EP 0374684 A	27-06-1990
		EP 0525829 A	03-02-1993
		JP 8220097 A	30-08-1996
		JP 2221860 A	04-09-1990
		JP 2541674 B	09-10-1996