

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 29.03.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 02.10.92 Bulletin 92/40.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BERTIN & CIE, société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Binot Patrick et Dutertre Bernard.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Ores.*

⑤4 Procédé et dispositif de détection rapide de micro-organismes indésirables dans un produit du domaine agro-alimentaire ou médico-vétérinaire.

⑤7 Procédé et dispositif de détection rapide de la présence (ou de l'absence) de micro-organismes indésirables, dans un échantillon de taille et/ou de volume important, à l'état liquide, semi-liquide, gélifié, pâteux ou solide.

Ledit procédé de détection est caractérisé en ce qu'il comprend:

(1) une étape de criblage des micro-organismes recherchés, par immunoséparation des différents germes éventuellement présents dans l'échantillon de départ, par fixation sélective de chacun desdits germes sur un support approprié comprenant des anticorps convenables; et

(2) une étape de détection des germes éventuellement fixés sur le support approprié par:

(a) libération de l'acide nucléique desdits germes, par tout moyen convenable;

(b) amplification de l'acide nucléique libéré et recherché, si nécessaire;

(c) hybridation de l'acide nucléique libéré avec au moins une sonde appropriée, spécifique du germe dont la présence est soumise à contrôle; et

(d) détection de l'hybride éventuellement formé, par tout moyen approprié.

FR 2 674 632 - A1



La présente invention a pour objet un procédé et un dispositif de détection rapide de la présence (ou de l'absence) de micro-organismes indésirables, dans un échantillon de taille et/ou de volume important, à l'état
5 liquide, semi-liquide, gélifié, pâteux ou solide.

On entend, au sens de la présente invention, par échantillon de taille importante, un échantillon d'une quantité de l'ordre de plusieurs grammes ; un échantillon conforme à l'invention peut notamment être un
10 produit du domaine agro-alimentaire ou médico-vétérinaire (fluide biologique, par exemple).

La détection qualitative et quantitative rapide de la présence de micro-organismes, tels que bactéries, levures, moisissures, parasites et virus, même
15 présents en quantité extrêmement faible, dans des produits alimentaires, des produits d'hygiène ou des fluides, s'avère obligatoire dans le cadre de normes de qualité telles que celle définie dans l'Arrêté du 21 décembre 1979, norme relative aux critères microbiologiques
20 auxquels doivent satisfaire certaines denrées (par exemple absence de Salmonella dans 25 g d'échantillon ou de Staphylocoque dans 1 g d'échantillon).

Pour détecter la présence d'un micro-organisme, dans un produit donné, il existe à l'heure
25 actuelle, un certain nombre de méthodes.

On peut citer tout d'abord, la mise en culture de l'échantillon de produit à tester ; cette méthode permet une multiplication sélective des micro-organismes, dont la présence (ou l'absence) est ensuite contrôlée par
30 exemple par coloration sélective et examen microscopique ou par toute autre méthode appropriée, et notamment l'utilisation d'une sonde dite immunitaire ou d'une sonde nucléique, la détection d'un métabolite spécifique, etc.... Cette méthode a l'avantage de permettre la détec-
35 tion de la contamination initiale de l'échantillon par un

seul micro-organisme, grâce au pouvoir multiplicateur de la culture.

Cependant, cette méthode a pour principaux inconvénients d'être longue à mettre en oeuvre, les micro-organismes éventuellement présents, se développant dans un délai de 2 à 30 jours ; de plus, cette méthode ne permet qu'une évaluation approximative du nombre de micro-organismes présents au départ et est donc peu quantitative.

10 On peut également citer l'immunodiagnostic, qui utilise les propriétés que possèdent des anticorps choisis, de se fixer très spécifiquement sur un antigène spécifique du germe à détecter.

15 Il est ainsi possible, par exemple, après filtration d'un échantillon de lait sur une membrane, de fixer sur les germes éventuellement retenus par ladite membrane, des anticorps marqués à l'aide d'un marqueur approprié (marqueur luminescent ou fluorescent, par exemple). Un examen de la membrane : microscopique, à l'oeil nu ou par des techniques de reconnaissance d'image, permet alors de distinguer la présence (ou de constater l'absence) du germe recherché.

25 Ces techniques ont pour avantages principaux leur rapidité, leur aspect quantitatif (possibilité de mesurer le nombre approximatif de germes contenus dans l'échantillon) et la spécificité correspondant à celle du couple antigène-anticorps choisi. Cependant, l'immunodiagnostic a pour inconvénients principaux, une spécificité correspondant au couple antigène-anticorps choisi, qu'il n'est pas toujours possible de trouver suffisamment spécifique du germe précis recherché et une sensibilité généralement insuffisante pour détecter la présence, par exemple, d'une seule bactérie dans plusieurs grammes d'échantillons, comme exigé notamment dans le contrôle de
35 qualité des aliments.

On peut également citer la détection par sondes nucléiques, qui utilise la propriété que possède une sonde constituée d'un brin d'acide nucléique (ADN, par exemple), de se lier très sélectivement avec un autre
5 brin d'acide nucléique comportant les bases complémentaires du premier brin (séquence complémentaire). En marquant la sonde par un marqueur approprié, radioactif ou fluorescent par exemple, il est possible de détecter la présence d'une séquence d'acide nucléique spécifique du
10 germe particulier à détecter.

De manière générale, cette méthode consiste à lyser l'échantillon, à en extraire l'ADN, à en amplifier sélectivement les brins recherchés, dont la présence est détectée par hybridation avec la sonde spécifique choisie.
15

La technique par hybridation a pour avantages principaux : sa rapidité, car l'ensemble des opérations sur l'échantillon peut s'effectuer dans une journée, compte-tenu de la rapidité des techniques d'amplification, sa spécificité, sa sensibilité et sa semi-quantitativité ; cependant, la technique par hybridation présente comme inconvénient principal, la difficulté, sinon l'impossibilité, technico-économique, d'extraire l'acide nucléique d'un échantillon aussi important que ce
20 qu'exige certaines normes, de l'industrie agroalimentaire notamment, et de procéder à l'amplification et à la détection sélective d'une séquence particulière avec le fort bruit de fond engendré lorsqu'il s'agit par exemple de détecter la présence d'une seule bactérie dans un
25 échantillon de viande de plusieurs grammes.
30

Cet inconvénient est une limitation majeure pour l'utilisation de sondes nucléiques pour le contrôle de qualité dans l'industrie agro-alimentaire.

L'ensemble des techniques précitées ne permettent donc pas la détection, dans un délai court et sur
35 des échantillons de plusieurs grammes, comme l'exige la

réglementation, de la présence ou de l'absence d'une seule bactérie.

En conséquence, la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à un procédé et à un dispositif de
5 détection et de numération de micro-organismes, qui répond mieux aux besoins de la pratique que les procédés et dispositifs de l'Art antérieur, notamment en ce qu'il permet de répondre aux exigences réglementaires dans le domaine du contrôle de qualité des denrées alimentaires,
10 à savoir la détection de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme, dans un échantillon important, de l'ordre de plusieurs grammes.

La présente invention a pour objet un procédé de détection d'au moins un micro-organisme ou germe dans
15 un échantillon de grand volume et/ou de grande taille, notamment un produit alimentaire, un produit d'hygiène ou un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape de criblage des micro-organismes recherchés, par immunoséparation des différents germes
20 éventuellement présents dans l'échantillon de départ, par fixation sélective de chacun desdits germes sur un support approprié comprenant des anticorps convenables (1er réactif) ; et

(2) une étape de détection des germes éventuellement fixés sur le support approprié par :

(a) libération de l'acide nucléique desdits germes, par tout moyen convenable ;

(b) amplification de l'acide nucléique libéré et recherché, si nécessaire ;

30 (c) hybridation de l'acide nucléique libéré avec au moins une sonde appropriée (2ème réactif), spécifique du germe dont la présence est soumise à contrôle ; et

(d) détection de l'hybride éventuellement
35 formé, par tout moyen approprié.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, lorsque l'échantillon de départ est solide, préalablement à l'étape (1), ledit échantillon est soumis à une congélation puis à un cryo-
5 broyage, jusqu'à obtention de fines particules ne détruisant pas les germes recherchés et à une dilution appropriée de l'échantillon pulvérisé.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, l'étape (1),
10 c'est-à-dire le criblage immunologique des germes recherchés présents dans l'échantillon liquide ou rendu liquide (immunoséparation), comme précisé ci-dessus, est réalisée par filtration sur au moins une membrane sur laquelle sont greffés des anticorps spécifiques du(des) micro-
15 organisme(s) à détecter, laquelle membrane retient ainsi le germe ou la famille de germes correspondant à l'anticorps greffé, et laisse passer le reste de l'échantillon.

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre
20 avantageux du procédé conforme à l'invention, l'étape (1), c'est-à-dire le criblage immunologique des germes recherchés présents dans l'échantillon liquide ou rendu liquide (immunoséparation), est réalisée par percolation de l'échantillon sur au moins un lit de microbilles greffées avec au moins un anticorps spécifiques du(des)
25 micro-organisme(s) à détecter, puis élimination de l'échantillon non retenu.

Conformément à l'invention, l'étape (a), c'est-à-dire la libération de l'acide nucléique des
30 germes retenus sur le support convenable, est réalisée par lyse.

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, préalablement à l'étape (c) d'hybridation, l'acide nucléique, éventuelle-
35 ment digéré par des enzymes de restriction appropriées,

est amplifié à l'aide d'amorces choisies pour amplifier, la/les séquences spécifiques recherchées.

Dans le cas de la détection de plusieurs germes de types différents, dans le même échantillon, l'étape (1) du procédé conforme à l'invention est réalisée en série sur plusieurs supports, greffés, chacun avec un anticorps différent, spécifique de chaque germe à détecter, afin d'assurer l'identification séparée et simultanée de ces germes distincts.

Le procédé conforme à l'invention, outre le fait qu'il résout de manière simple et rapide, c'est-à-dire pratiquement sans délai, le problème posé par les normes réglementaires dans le domaine des tests de qualité des produits agro-alimentaires, présente les avantages suivants :

- rapidité d'examen : le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas de préculture et l'ensemble des opérations peut être réalisé en quelques heures ;
- possibilité d'examiner des échantillons de volume et/ou de taille important, dans la mesure où l'étape de concentration en micro-organismes permet d'éliminer l'essentiel de l'échantillon, de ramener à un volume raisonnable la portion d'échantillon à traiter par les techniques de la biologie moléculaire et d'éliminer l'essentiel du bruit de fond important constitué par l'ADN de germes non pathogènes et surtout l'ADN propre à l'échantillon étudié ;
- spécificité améliorée par l'utilisation successive d'un crible immunitaire (immunoséparation) et d'un crible nucléique ; en effet, la combinaison des étapes (1) de criblage immunologique (immunodiagnostic), avec utilisation d'un anticorps comme premier réactif et (2) d'identification d'acide nucléique (détection par hybridation), avec utilisation d'une sonde nucléique comme deuxième réactif, permet de manière inattendue d'obtenir un procédé très spécifique vis-à-vis du/des

germes à détecter, même si chacun des réactifs utilisé n'est ni très spécifique, ni très sélectif vis-à-vis des germes à contrôler. Ceci permet notamment d'utiliser des réactifs moins coûteux ;

5 - capacité à détecter la présence d'un seul germe dans l'échantillon initial : la capacité de piégeage immunitaire peut être augmentée en jouant sur le choix du couple antigène-anticorps choisi, sur la concentration en anticorps (loi d'action de masse) et le temps
10 de contact ; de plus, la capacité de détection par sonde nucléique n'est pas limitée par le fait qu'un seul germe soit initialement présent, du fait de l'amplification possible ;

 - l'étape (1) a également l'avantage majeur
15 d'éliminer le bruit de fond dû à la présence notamment de l'acide nucléique issu de germes non recherchés et de la fraction cellulaire de l'échantillon.

 La présente invention a également pour objet un dispositif de recherche et de détection de micro-
20 organismes dans un échantillon de taille et/ou de volume important, caractérisé en ce qu'il comprend :

 - au moins un support recouvert d'anticorps appropriés ;

 - des moyens de mises en suspension et/ou de
25 dilution de l'échantillon à analyser ;

 - des moyens de mise en contact échantillon-support, pendant un temps approprié ;

 - des moyens de traitement du/des supports pour libérer l'acide nucléique du germe à détecter, éventuellement fixé sur ledit/lesdits supports ;
30

 - des moyens d'amplification sélective de l'acide nucléique recherché, si nécessaire ;

 - des moyens d'hybridation de l'acide nucléique libéré ;

35 - des moyens de détection appropriés de l'hybride ; et

- un moyen d'automatisation pour la commande séquentielle, dudit moyen de mise en contact échantillon-support, des moyens de traitement du support, des moyens d'hybridation et des moyens de détection, si nécessaire.

5 Lorsque ledit dispositif comprend plusieurs supports, il inclut en outre des moyens de séparation des supports.

Ledit support est avantageusement choisi dans le groupe qui comprend des membranes appropriées, notamment des membranes filtrantes et des microbilles appropriées, lequel support est en outre apte à greffer des anticorps appropriés.

10 Les moyens de mise en contact échantillon-support peuvent avantageusement être constitués par de simples moyens d'agitation ou des moyens de circulation de l'échantillon liquide ou préalablement rendu liquide, en boucle, afin d'assurer plusieurs circulations de l'échantillon sur le support et garantir ainsi le piégeage du germe éventuellement présent dans l'échantillon.

15 Les moyens de traitement sont avantageusement constitués par des moyens d'introduction de réactifs de lyse appropriés éventuellement associés à un poste de traitement par digestion desdits acides nucléiques libérés et à un poste d'amplification de l'acide nucléique.

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention et à une description détaillée du dispositif avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

25 - la figure 1 représente une vue schématique illustrant un dispositif conforme à l'invention dans lequel le support est représenté par une pluralité de membranes amovibles ;

- la figure 2 représente un support sous forme d'une membrane filtrante divisée en une pluralité de zones différentes ;

- la figure 3 représente un autre dispositif
5 conforme à l'invention dans lequel le support est représenté par des microbilles de verre.

Il doit être bien entendu, toutefois, que les exemples, les dessins et les parties descriptives correspondantes, sont donnés uniquement à titre d'illustration
10 de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Le dispositif représenté aux figures 1 à 3 est destiné à la détection rapide de micro-organismes dans un échantillon de grande taille et/ou de grand volume,
15 conformément au procédé décrit ci-dessus qui comprend essentiellement deux étapes :

(1) une étape de criblage immunologique des germes par immunoséparation, et

(2) une étape de détection qui comprend :

20 (a) la libération de l'acide nucléique,
(b) l'amplification de l'acide nucléique libéré, si nécessaire,

(c) l'hybridation dudit acide nucléique avec une sonde appropriée et

25 (d) la détection de l'hybride, et qui permet la recherche de germes tels que ceux mentionnés dans l'Arrêté du 21 décembre 1979 cité ci-dessus.

La figure 1 représente une vue schématique d'un dispositif conforme à l'invention comprenant une en-
30 ceinte E contenant un empilement de membranes A, B,...Z montées entre une tubulure 10 d'entrée de l'échantillon sous forme liquide et une tubulure de sortie 12 de l'échantillon à recycler, lesquelles tubulures sont reliées entre elles par une canalisation 13.

Un conduit 11 d'évacuation de l'échantillon non retenu, par exemple après traitement, est également prévu.

Chaque membrane comprend un anticorps distinct
5 non spécifique et/ou spécifique (1er réactif) et permet ainsi une fixation sélective à sa surface, du germe à retenir.

Des moyens d'entrée T_1 de réactifs, et notamment de tampons de traitement permettent de lyser les
10 germes retenus sur lesdites membranes, afin de permettre l'hybridation et la détection desdits acides nucléiques ; lesdits tampons sont notamment évacués par le conduit 11.

Les différentes membranes sont séparées, dans la réalisation représentée, par pivotement autour de
15 l'axe Y, qui amène lesdites membranes, successivement dans la zone H, par exemple à l'aide d'un automate de type connu, qui comprend notamment des tubulures d'entrée de réactifs 16₁-16₃ (sondes, enzymes de restriction, amorces, notamment) et un conduit d'évacuation des
20 milieux usés, et notamment des sondes non fixées.

L'hybridation puis la détection de l'hybride éventuellement formé est réalisée au niveau de cette zone H, successivement sur chaque membrane.

La figure 2 représente un support sous forme
25 de membrane filtrante séparée en zones A, B, C...Z, comportant chacune un anticorps distinct.

L'échantillon liquide est passé à travers lesdites zones (mise en contact suffisante assurée par capillarité).

30 Sur chaque zone séparée, une hybridation appropriée est réalisée, puis on détecte l'hybride éventuellement formé.

A la figure 3, dans laquelle le support, inclus dans une enceinte E, est constitué de microbilles
35 notamment en verre, éventuellement confinées entre deux membranes appropriées, l'échantillon liquide est mis en

contact avec lesdites billes recouvertes d'un anticorps approprié, par la tubulure d'entrée 10'.

On récupère les différentes microbilles qui peuvent varier selon leur taille et qui ont éventuellement piégé les germes à détecter, puis on lyse lesdits germes et on élue au moyen d'un tampon approprié, afin de récupérer, dans une enceinte, dite d'amplification, non représentée, l'acide nucléique, qui peut éventuellement être amplifié.

10 L'acide nucléique amplifié est ensuite hybridé, par exemple sur membrane, avec une sonde appropriée, puis l'hybride est détecté.

En variante, l'enceinte E est fermée à sa partie inférieure ; après réalisation de l'étape (1) de criblage immunologique, les autres opérations sont réalisées après rotation de 180° de l'enceinte E.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente.

REVENDEICATIONS

1*) Procédé de détection d'au moins un micro-organisme ou germe dans un échantillon de grand volume et/ou de grande taille, notamment un produit alimentaire, un produit d'hygiène ou un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) une étape de criblage des micro-organismes recherchés, par immunoséparation des différents germes éventuellement présents dans l'échantillon de départ, par fixation sélective de chacun desdits germes sur un support approprié comprenant des anticorps convenables ; et

(2) une étape de détection des germes éventuellement fixés sur le support approprié par :

(a) libération de l'acide nucléique desdits germes, par tout moyen convenable ;

(b) amplification de l'acide nucléique libéré et recherché, si nécessaire ;

(c) hybridation de l'acide nucléique libéré avec au moins une sonde appropriée, spécifique du germe dont la présence est soumise à contrôle ; et

(d) détection de l'hybride éventuellement formé, par tout moyen approprié.

2*) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsque l'échantillon de départ est solide, préalablement à l'étape (1), ledit échantillon est soumis à une congélation puis à un cryobroyage, jusqu'à obtention de fines particules ne détruisant pas les germes recherchés et à une dilution appropriée de l'échantillon pulvérisé.

3*) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape (1), c'est-à-dire le criblage immunologique des germes recherchés présents dans l'échantillon liquide ou rendu liquide, est réalisée par filtration sur au moins une membrane sur laquelle sont greffés des anticorps spécifiques du/des micro-organisme(s) à détecter, laquelle membrane retient

ainsi le germe ou la famille de germes correspondant à l'anticorps greffé, et laisse passer le reste de l'échantillon.

4') Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape (1), c'est-à-dire le criblage immunologique des germes recherchés présents dans l'échantillon liquide ou rendu liquide, est réalisée par percolation de l'échantillon sur au moins un lit de microbilles greffées avec au moins un anticorps spécifiques du(des) micro-organisme(s) à détecter, puis élimination de l'échantillon non retenu.

5') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape (a), c'est-à-dire la libération de l'acide nucléique des germes retenus sur le support convenable, est réalisée par lyse.

6') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (c) d'hybridation, l'acide nucléique, éventuellement digéré par des enzymes de restriction appropriées, est amplifié à l'aide d'amorces choisies pour amplifier, la/les séquences spécifiques recherchées.

7') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que dans le cas de la détection de plusieurs germes de types différents, dans le même échantillon, l'étape (1) est réalisée en série sur plusieurs supports, greffés, chacun avec un anticorps différent, spécifique de chaque germe à détecter, afin d'assurer l'identification séparée et simultanée de ces germes distincts.

8') Dispositif de recherche et de détection de micro-organismes dans un échantillon de taille et/ou de volume important, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un support (A, B, ... Z, A') recouvert d'anticorps appropriés ;

- des moyens de mises en suspension et/ou de dilution de l'échantillon à analyser ;

- des moyens de mise en contact échantillon-support (10, 12, 13), pendant un temps approprié ;

5 - des moyens de traitement (T_1) du/des supports pour libérer l'acide nucléique du germe à détecter, éventuellement fixé sur ledit/lesdits supports ;

- des moyens d'amplification sélective de l'acide nucléique libéré, si nécessaire ;

10 - des moyens d'hybridation (H ; 16₁-16₃) de l'acide nucléique libéré ;

- des moyens de détection appropriés de l'hybride ; et

15 - un moyen d'automatisation pour la commande séquentielle, dudit moyen de mise en contact échantillon-support, des moyens de traitement du support, des moyens d'hybridation et des moyens de détection, si nécessaire.

9') Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce que lorsqu'il comprend plusieurs supports, il inclut en outre des moyens (Y) de séparation
20 des supports.

10') Dispositif selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que ledit support est avantageusement choisi dans le groupe qui comprend des
25 membranes appropriées, notamment des membranes filtrantes et des microbilles appropriées, lequel support est en outre apte à greffer des anticorps appropriés.

11') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que les moyens
30 de mise en contact échantillon-support sont constitués par des moyens de circulation de l'échantillon liquide ou préalablement rendu liquide, en boucle, afin d'assurer plusieurs circulations de l'échantillon sur le support et garantir ainsi le piégeage du germe éventuellement pré-
35 sent dans l'échantillon.

12') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que les moyens de traitement sont avantageusement constitués par des moyens d'introduction de réactifs de lyse appropriés éventuellement associés à un poste de traitement par digestion desdits acides nucléiques libérés et à un poste d'amplification de l'acide nucléique.

FIG. 1

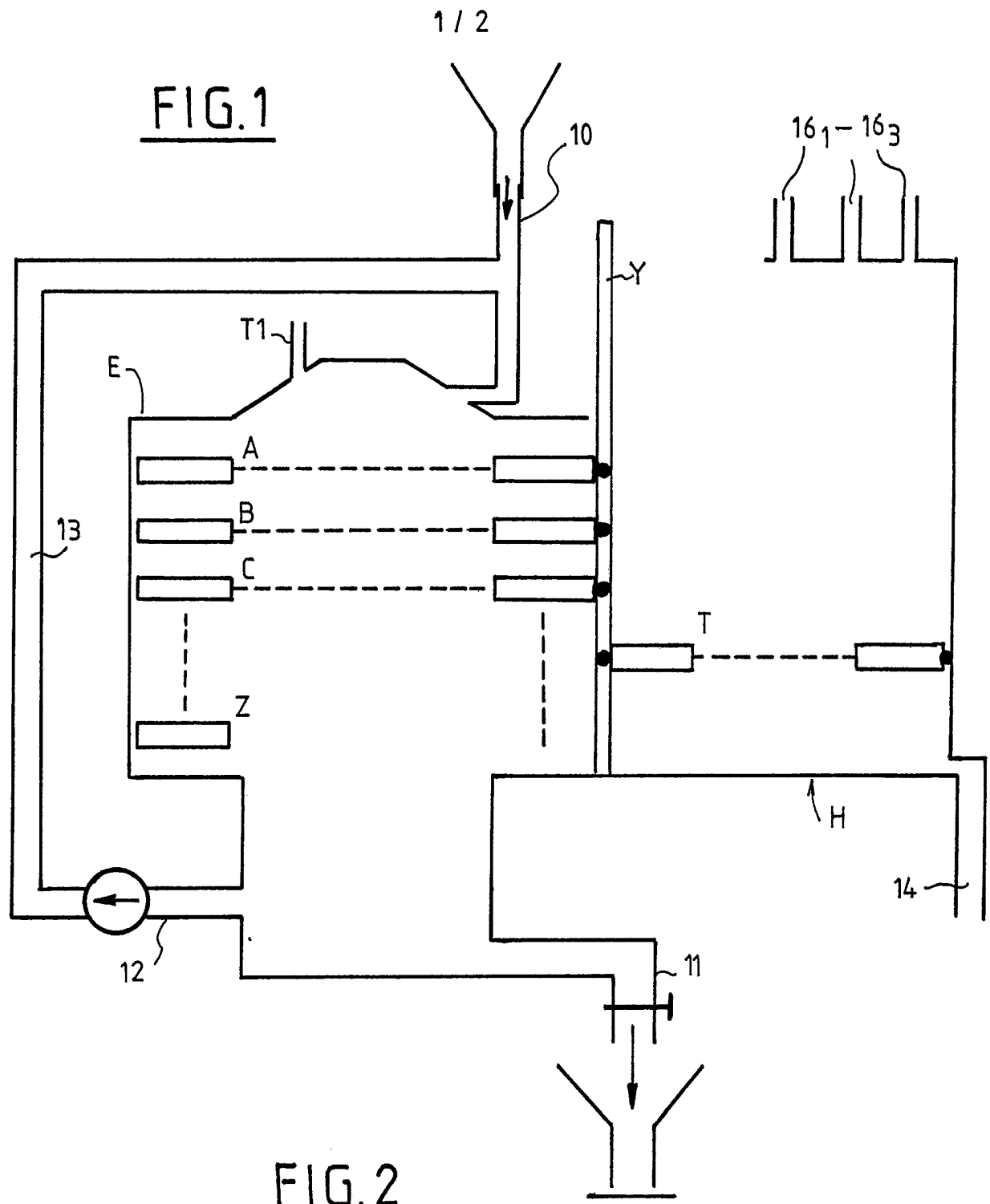


FIG. 2

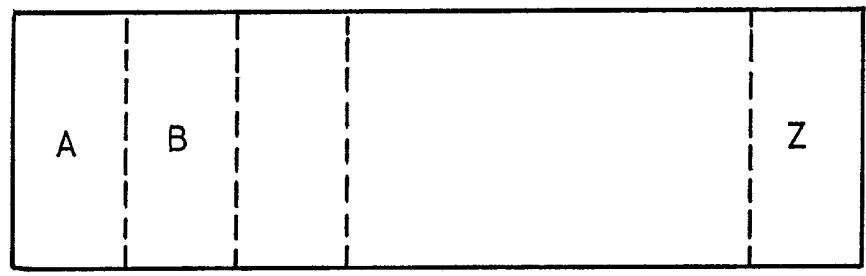
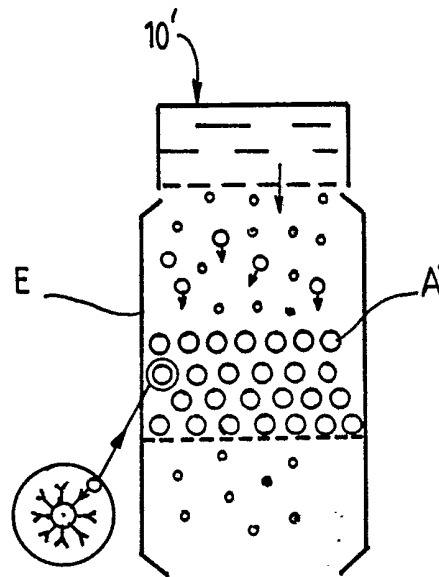


FIG. 3



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

FR 9103848
FA 456057

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP-A-366448 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) * le document en entier *	1, 3-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) G01N C12Q C12M C12N
A	---	10, 11	
X	EP-A-402997 (AKZO NV) * le document en entier *	1, 3-6	
A	---	10	
X	EP-A-145356 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) * abrégé *	1, 3, 4, 6	
X	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA vol. 87, no. 8, avril 1990, Washington, DC pages 2867 - 2871; Jansen et al.: "Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method" * pages 2867 - 2868 *	1, 6	
A	EP-A-235727 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) * revendications 1, 2, 5 *	1, 3-5	
A	EP-A-293782 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES LIMITED) * abrégé *	9	

Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
02 DECEMBRE 1991		CEDER O.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	