



(11)

EP 2 789 682 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
15.10.2014 Bulletin 2014/42

(51) Int Cl.:
C11D 11/00 ^(2006.01) **C11D 3/48** ^(2006.01)
C11D 3/386 ^(2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **13163533.6**

(22) Date de dépôt: **12.04.2013**

(84) Etats contractants désignés:
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**
Etats d'extension désignés:
BA ME

- **Blackman, Gordon**
1380 Lasne (BE)
- **Gathy, Camille**
1341 Cérroux-Mousty (BE)

(71) Demandeur: **Realco**
1348 Louvain-La-Neuve (BE)

(74) Mandataire: **Coulon, Ludivine et al**
Gevers & Vander Haeghen
Holidaystraat 5
1831 Diegem (BE)

(72) Inventeurs:
• **Fastrez, Sébastien**
7000 Mons (BE)

(54) **Procédé d'élimination de biofilms pour le nettoyage d'instruments médicaux, en particulier pour lutter contre les maladies nosocomiales**

(57) Procédé d'élimination de biofilms pour le nettoyage d'instruments médicaux, en particulier pour lutter contre les maladies nosocomiales, comprenant une étape de traitement de surface pendant une période de

temps prédéterminée avec une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique et une étape de rinçage et/ou de séchage de ladite surface.

EP 2 789 682 A1

Description

[0001] La présente invention se rapporte à un procédé d'élimination de biofilms pour le nettoyage d'instruments médicaux, en particulier pour lutter contre les maladies nosocomiales.

[0002] Un biofilm est une pellicule visqueuse qui se développe sur toutes les surfaces, suite à l'adhésion de microorganismes sur ces surfaces et à la sécrétion par ceux-ci de polymères qui les recouvrent et facilitent leur adhésion. Les biofilms constituent ainsi une couche de protection autour des microorganismes et représentent une source récurrente de contamination du milieu environnant qui pose des problèmes majeurs en termes de santé, par exemple dans les milieux hospitaliers. Les biofilms se retrouvent dans de nombreux environnements, par exemple dans les circuits d'eau, les tours de refroidissement, sur tout matériel immergé (coque bateau, ...) mais aussi sur les dents (plaque) ou dans les intestins et tout particulièrement sur les instruments médicaux utilisés en milieu hospitalier.

[0003] L'accumulation des polymères sécrétés par les bactéries (protéines et polysaccharides principalement) crée une matrice qui protège ces microorganismes des agressions extérieures et qui présente une très forte résistance aux procédures de nettoyage et de désinfection conventionnelles. Les microorganismes s'y développent et contaminent le milieu environnant. Les biofilms constituent dès lors une source de contamination critique car ils sont présents partout, représentant ainsi un haut risque de contamination puisqu'ils sont très difficiles à éliminer.

[0004] On observe malheureusement que cette matrice est très résistante et peut constituer une barrière protégeant les bactéries des agents qui agiraient contre les microorganismes. Les traitements classiques à base de soude et/ou comportant différents biocides n'agissent pas de manière suffisamment efficace car ils ne pénètrent pas le biofilm dans toute son épaisseur ou sont inhibés par certaines molécules composant cette matrice. Le traitement n'est alors que partiellement efficace sur la surface supérieure du biofilm.

[0005] Or, de nos jours, l'hygiène est devenue une problématique de première importance dans l'industrie alimentaire. En effet, les problèmes de contamination sont en augmentation alors que les moyens de désinfections utilisés sont de plus en plus puissants. Par ailleurs, cette problématique doit être adressée par une approche globale, notamment en ce qui concerne le phénomène de résistance.

[0006] On connaît du document WO2012/048757 une composition et un procédé d'élimination des biofilms pour le nettoyage des sols et des surfaces dans les industries agro-alimentaires. Plus particulièrement, la composition divulguée dans ce document est destinée aux traitements et aux nettoyages d'installations dans le domaine de l'industrie alimentaire où des bactéries propres à ce secteur d'activité sécrètent des biofilms protecteurs responsables d'une source récurrente de contamination des aliments et/ou des installations des industries agro-alimentaires.

[0007] Une problématique similaire est observée en milieu hospitalier où se développent de nombreux microorganismes responsables de la formation de biofilms qui sont détectés en de nombreux endroits, tant au niveau des patients (prothèses, plaies, système respiratoire, ...) qu'au niveau de l'environnement (salle d'opération, matériel chirurgical, équipements de maintenance de ce matériel, endoscopes, sondes urinaires, cathéters, équipement médical, appareil de dialyse ou de ventilation assistée des patients, ...) et des surfaces (sols, murs, chambres, lits, matelas, ...).

[0008] Dans le domaine de l'industrie alimentaire mais de façon encore plus conséquente en milieu hospitalier, la problématique de la présence de biofilms est double. Premièrement, ceux-ci représentent une source de contamination permanente et très difficile à éliminer par des moyens conventionnels, même les plus agressifs. En effet, les désinfectants classiques sont inefficaces car ils ne parviennent pas à atteindre les microorganismes qui sont protégés par le biofilm. Leur élimination incomplète entraîne et accélère des transferts de contamination de patients à patients dès lors qu'ils sont pratiquement invisibles. Pourtant, à la suite de chocs ou de frottements, des pellicules de biofilms peuvent se détacher et libérer des bactéries qui y étaient logées. En effet, ces bactéries cachées sont par exemple libérées suite à un choc ou à un frottement d'un outil chirurgical sur un chariot ou suite au frottement d'un lit contre une porte, ce qui permet un libre transfert des bactéries à un patient souvent en condition fragile. Cette problématique est une des causes des maladies nosocomiales problématiques. Dans le cas d'outil comme des râpes orthopédiques, cette problématique est encore plus criante dès lors que l'utilisation conventionnelle de l'outil provoque l'abrasion et le détachement de pellicules de biofilms. Par conséquent, les bactéries sont libérées directement dans le corps humain qui représente un incubateur vivant parfait pour leur prolifération. Ces microorganismes emprisonnés dans les biofilms, grâce à la résistance et à la protection que leur apporte le biofilm, représentent donc un risque très élevé de contamination des patients suivants.

[0009] Deuxièmement, un biofilm est mixte. C'est-à-dire que, développé par certaines souches, un biofilm peut abriter d'autres souches, qui vivent et se développent alors en colonies. Ces colonies favorisent la communication entre bactéries et, entre autre, l'échange de gènes. La propagation des gènes de résistance portés par certaines bactéries est ainsi facilitée au sein des biofilms qui sont alors encore plus difficiles à éliminer. A ce sujet, les hôpitaux constituent un environnement particulièrement propice à ces échanges de gènes puisque de nombreuses bactéries y cohabitent, par exemple dans les chambres, dans les salles d'opérations mais aussi sur les instruments médicaux (râpes orthopédiques, alésoirs, canules, endoscopes, ...). Dans les biofilms, le problème est encore accentué car ces souches ne sont même pas atteintes par les désinfectants, protégées par la matrice du biofilm.

[0010] C'est pourquoi, de par la source de contamination persistante qu'ils représentent et de par leur présence

répandue, il est estimé que les biofilms sont responsables de 65% des maladies nosocomiales (maladies contractées dans un établissement de santé). Leur impact sur cette problématique très critique en milieu hospitalier est donc élevé, en parallèle avec leur participation au développement de phénomènes de résistance.

[0011] Malheureusement, les techniques de nettoyage et de désinfection classiques appliquées actuellement en milieu hospitalier montrent certaines limites quant à l'élimination des biofilms pour lutter contre les maladies nosocomiales. Ceci est principalement lié à leur inaptitude à attaquer la matrice de polymères qui protège les microorganismes. En effet, les détergents « classiques » ne permettent pas de décoller cette matrice et les oxydants puissants ne la dissolvent que partiellement. Les désinfectants et/ou biocides utilisés à posteriori sont dès lors inefficaces car ils ne peuvent pas atteindre les microorganismes. De plus il a été démontré que les bactéries sécrètent des substances qui ont un impact sur l'efficacité des biocides, ce qui limite d'autant plus l'action de ces derniers.

[0012] Actuellement, il est donc particulièrement difficile d'éliminer les biofilms pourtant en grande partie responsable des maladies nosocomiales en milieu hospitalier. Il existe donc un réel besoin de mettre au point une composition et un procédé d'élimination des biofilms de surfaces telles que par exemple celles des instruments médicaux, particulièrement pour lutter contre les maladies nosocomiales puisque les techniques de nettoyage actuelles ne sont pas suffisamment efficaces.

[0013] L'invention a pour but de pallier ces inconvénients en procurant un procédé tel qu'indiqué au début, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de surface pendant une période de temps prédéterminée avec une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique et une étape de rinçage et/ou de séchage de ladite surface.

[0014] Avantageusement, suivant l'invention, ledit composant détergent comprend un agent mouillant et un agent dispersant.

[0015] De préférence, suivant l'invention, ledit composant détergent comprend en outre un agent séquestrant.

[0016] Préférentiellement, suivant l'invention, ledit au moins un composant enzymatique contient par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.

[0017] Avantageusement, selon la présente invention, ledit agent mouillant et ledit agent dispersant forment un prémix et sont donc mélangés ensemble.

[0018] Dans le cadre de la présente invention, il a été montré qu'un tel traitement avec une telle composition selon l'invention permet aux enzymes (protéases, laccases, polysaccharidases) de dégrader efficacement et de manière polyvalente les polymères organiques de différentes natures constituant la matrice des biofilms formés par une multitude de microorganismes différents responsables directement ou indirectement des maladies nosocomiales. Sous l'action des enzymes et conjointement à l'action du composant détergent, la matrice du biofilm est fragilisée et gonflée, ce qui permet de l'éliminer de la surface traitée. Par ailleurs, de façon surprenante, il a également été montré que le procédé selon l'invention n'est pas spécifique à un microorganisme particulier et donc à un type de biofilm particulier mais qu'il est adapté à de nombreuses souches bactériennes, les enzymes agissant sur les polymères des matrices des biofilms formés par n'importe quel microorganisme. L'action détergente de la composition selon l'invention permet en outre d'assurer l'efficacité de la composition suivant l'invention. A cette fin, il est prévu suivant l'invention une base détergente qui soit compatible et qui puisse agir de manière synergique avec l'activité enzymatique du composant enzymatique. En outre, suivant l'invention, il est prévu une base détergente qui permette d'améliorer significativement la rapidité et l'efficacité de l'élimination du biofilm. C'est pour ces raisons que la présente invention associe un agent mouillant et un agent dispersant et éventuellement un agent séquestrant. Les actions conjointes de ces agents du composant détergent de la composition selon l'invention permet d'éliminer la partie superficielle du biofilm, de mouiller et de gonfler les structures organiques du biofilm favorisant donc de cette façon l'accessibilité du composant enzymatique qui fragilise et dégrade à son tour la matrice du biofilm.

[0019] De façon tout aussi inattendue, il a été déterminé, dans le cadre de la présente invention, qu'un tel traitement agit efficacement sur les microorganismes responsables des maladies nosocomiales et spécifiquement retrouvés en milieu hospitalier. Contre toute attente, il a été montré que le traitement suivant l'invention permet d'obtenir des résultats nettement et significativement supérieurs en termes d'élimination des biofilms par rapport aux techniques de traitement actuellement appliquées en milieu hospitalier.

[0020] De préférence, selon le procédé suivant l'invention, ladite étape de traitement de surface pour lutter contre les maladies nosocomiales comprend une étape d'élimination des biofilms permettant de réaliser un abattement des microorganismes responsables des maladies nosocomiales. En effet, selon la présente invention, il est considéré qu'une réduction (ou abattement) logarithmique d'au moins 1 Log des microorganismes protégés par les biofilms est significative pour permettre de lutter contre les maladies nosocomiales, ce qui correspond à un pourcentage de réduction d'au moins 90% des microorganismes protégés par les biofilms.

[0021] Cette réduction logarithmique est calculée en convertissant la charge microbienne en log 10, en soustrayant le résultat de l'échantillon test de l'échantillon témoin (contrôle), c'est-à-dire en soustrayant la charge microbienne présente dans un environnement donné (par exemple à la surface d'un outil médical ou à la surface d'un sol) avant une étape de traitement de surface suivant l'invention de la charge microbienne présente dans le même environnement

suite à une étape de traitement de surface suivant l'invention.

[0022] Il est bien entendu que toute autre technique bien connue de l'homme de métier et permettant de déterminer les quantités de microorganismes donnant lieu à la formation de biofilms avant et après traitement d'une surface peut également être utilisée dans le cadre de la présente invention.

[0023] De préférence, selon le procédé suivant l'invention, ladite étape de traitement de surface est réalisée par trempage pendant une période de temps prédéterminée comprise entre 20 minutes et 24 heures dans une solution de trempage comprenant ladite composition et une phase aqueuse de dilution préalablement formée. Un traitement par trempage est particulièrement indiqué pour nettoyer des surfaces ou des outils médicaux (râpes orthopédiques, alésoirs, canules, endoscopes...) dès lors que ces surfaces ou ces outils peuvent être plongés dans un conteneur (cuve, bassin, ...) rempli avec ladite solution de trempage. Par exemple, les outils médicaux peuvent séjourner plus ou moins longtemps, par exemple quelques minutes, quelques heures ou quelques jours dans la solution de trempage sans entraver la mise en oeuvre d'autres interventions médicales. Dans le cas des endoscopes, ladite solution de trempage peut être injectée dans les tuyaux des endoscopes pour en assurer le nettoyage.

[0024] Avantagusement, selon l'invention, ladite étape de traitement de surface par trempage est associée à une étape d'abrasion mécanique de ladite surface avec ladite solution de trempage, par exemple par brossage mécanisé ou manuel ou par traitement aux ultrasons. Une étape d'abrasion mécanique additionnelle permet à la solution de trempage comprenant ladite composition en phase aqueuse d'agir sur les différentes couches des biofilms mais aussi de participer mécaniquement à la déstructuration de la matrice polymère et ainsi ôter des pellicules de la surface des biofilms pour que les enzymes et les autres composants de ladite composition atteignent encore mieux les différentes couches des biofilms, ce qui assure un traitement optimal des surfaces afin d'éliminer efficacement les biofilms.

[0025] De préférence, selon le procédé suivant l'invention, le pH de ladite solution de trempage est ajusté à une valeur de pH comprise entre 7 et 8.

[0026] De préférence, selon l'invention, le procédé comprend en outre une étape supplémentaire ultérieure de traitement de ladite surface à l'aide d'un biocide. Un traitement biocide désinfectant additionnel, suite à l'action de la solution enzymatique lors de l'étape de traitement de surface par trempage, permet d'assurer la destruction des bactéries rendues libres en fin de traitement de ladite surface.

[0027] Eventuellement, cette étape de traitement à l'aide d'un agent biocide peut être suivie par une étape de stérilisation, par exemple par un passage à l'autoclave.

[0028] D'autres formes de réalisation du procédé suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

[0029] La présente invention porte également sur une nouvelle utilisation d'une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique, pour lutter contre les maladies nosocomiales par élimination de biofilms. Une élimination des biofilms par trempage dans la composition diluée permet de lutter efficacement contre les maladies nosocomiales puisque les composants enzymatiques de la solution aqueuse de trempage permettent de déstructurer et d'éliminer les biofilms des surfaces traitées de telle sorte que les biofilms, en grande partie responsables des maladies nosocomiales, sont éliminés. Cette action des enzymes est favorisée par le fait qu'elle a lieu en synergie avec l'action du composant détergent de la composition selon l'invention, lequel permet d'éliminer la partie superficielle du biofilm, de mouiller et de gonfler les structures organiques du biofilm et de favoriser ainsi l'accessibilité du composant enzymatique qui fragilise et dégrade à son tour la matrice du biofilm.

[0030] De préférence, selon l'invention, ledit composant détergent de la composition utilisée comprend un agent mouillant et un agent dispersant.

[0031] Avantagusement, selon l'invention, ledit composant détergent de la composition utilisée comprend en outre un agent séquestrant.

[0032] De préférence, selon l'invention, ledit composant enzymatique de la composition utilisée contient par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.

[0033] Plus particulièrement, la présente invention porte sur une utilisation d'une composition comprenant au moins un composant détergent comprenant un agent mouillant et un agent dispersant et éventuellement un agent séquestrant, et au moins un composant enzymatique contenant au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase, pour l'élimination de sources de contamination comprenant *Staphylococcus aureus* et/ou *Escherichia coli* et/ou *Pseudomonas aeruginosa*. Ces bactéries se développent particulièrement bien en milieu hospitalier et sont responsables de nombreuses infections. A titre d'exemple, le staphylocoque doré, retrouvé chez 15 à 30% des individus sains, est très résistant et se transmet dès lors très rapidement d'un patient à l'autre non seulement par transmission directe via le personnel soignant mais aussi par transmission indirecte via des objets (outils médicaux, ...) et même la poussière. Avec les bacilles, *Staphylococcus aureus* est considéré comme étant la principale bactérie responsable des infections hospitalières et il convient donc de contrôler sa dissémination responsable, en grande partie, des maladies nosocomiales entraînant la mort du patient.

[0034] L'invention porte aussi sur une utilisation d'une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique, pour le traitement de surfaces, d'outils médicaux ou de sols afin de lutter contre les maladies nosocomiales par trempage.

[0035] De préférence, ledit composant détergent de ladite composition utilisée comprend un agent mouillant et un agent dispersant.

[0036] Avantageusement, ledit composant détergent de ladite composition utilisée comprenant en outre un agent séquestrant.

[0037] Préférentiellement, ledit composant enzymatique de ladite composition utilisée contient par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.

[0038] D'autres formes de réalisation d'utilisation d'une composition par trempage suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

[0039] Le composant détergent comprenant un agent mouillant et un agent dispersant et éventuellement un agent séquestrant agit tout d'abord en éliminant une partie superficielle du biofilm et en mouillant et/ou en gonflant les structures organiques du biofilm.

[0040] Le composant détergent favorise donc l'accessibilité du composant enzymatique en déstructurant la matrice du biofilm. Le composant enzymatique agit ensuite en synergie avec le composant détergent et fragilise et dégrade à son tour la matrice du biofilm. Cette action combinée des trois types d'enzyme et du composant détergent, parfaitement compatible avec une action correcte des enzymes, favorise l'accessibilité à la composition des couches plus profondes et permet un détachement rapide et optimal de tout type de biofilm tout en préservant le substrat. Une telle composition suivant l'invention réduit en outre l'apport de composés extérieurs dans les installations lors de l'étape de nettoyage et simplifie donc les procédures de validation des étapes de nettoyage. Ainsi, le composant détergent permet aux enzymes d'agir rapidement sur l'ensemble des structures des biofilms, ce qui, en milieu hospitalier où les outils, les chambres et les salles d'opération doivent pouvoir être réutilisées très rapidement suite à une intervention, représente un avantage certain.

[0041] L'agent dispersant du composant détergent permet d'améliorer la séparation des particules d'une suspension afin de prévenir l'agglutination, l'agrégation et/ou la décantation. Ledit agent dispersant peut être un polymère soluble ou partiellement soluble dans l'eau tel que par exemple le polyéthylène glycol, les dérivés de la cellulose ou un polymère comprenant au moins un motif acide acrylique ou ester acrylique. Préférentiellement, l'agent dispersant est un polymère comprenant au moins un motif acide acrylique ou ester acrylique de formule générale $-(CH_2-CH-COOR)-$ dans lequel R représente un groupe hydrogène, alkyle ou alkyle substitué, aryle ou aryle substitué. En particulier l'agent dispersant est un polymère ayant un poids moléculaire moyen Mw compris approximativement entre 500 et 10000.

[0042] Plus préférentiellement, l'agent dispersant est un polymère de l'acide acrylique. En particulier, l'agent dispersant peut être un homopolymère de l'acide acrylique ayant un poids moléculaire moyen compris approximativement entre 2000 et 6000.

[0043] Dans une variante avantageuse selon l'invention, le composant détergent comprend une proportion l'agent dispersant comprise entre 1 et 10% en poids par rapport au poids total du composant détergent.

[0044] Plus particulièrement, selon la présente invention, ledit agent dispersant dudit composant détergent est l'alkylglucoside en C_6 .

[0045] La présence d'un agent dispersant dans la composition suivant l'invention pour éliminer les biofilms et lutter contre les maladies nosocomiales permet d'éviter toute agrégation de particules bactériennes lors du nettoyage de surfaces, ce qui assure une élimination optimale des particules de biofilms détachées d'un support sous l'action des enzymes. En effet, plutôt que de s'agréger, ces particules restent séparées dans une suspension, ne se redéposent pas et ne ré-adhèrent pas sur le support nettoyé.

[0046] L'agent mouillant du composant détergent est une substance chimique amphiphile, ou une composition comprenant ladite substance chimique amphiphile, qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces. L'agent mouillant a pour avantage de favoriser l'étalement d'un liquide sur un solide mais aussi d'accentuer le contact entre deux surfaces. Plus particulièrement, l'agent mouillant favorise un contact entre le composant détergent et une surface et, par conséquent, entre les enzymes et leur substrat. Or, en milieu hospitalier, les surfaces à traiter sont souvent en inox ou en un matériau sur lequel l'application d'un liquide donne lieu à la formation de gouttelettes. Cette caractéristique des surfaces à traiter rend difficile une application homogène d'une composition sous forme liquide pour lutter contre la présence de biofilms. C'est pourquoi, l'agent mouillant est un constituant particulièrement avantageux de ladite composition selon l'invention puisqu'il permet, même sur des surfaces de type inox, un étalement homogène de la composition et ainsi sa répartition parfaite sur les surfaces à décontaminer, par exemple sur les outils chirurgicaux et les sols.

[0047] L'agent mouillant peut être anionique, cationique, non-ionique ou zwitterionique. Préférentiellement, l'agent mouillant peut être un mouillant anionique ou non-ionique, c'est-à-dire que la partie hydrophile est chargée négativement ou ne comporte aucune charge nette, ou peut être une composition comprenant un mouillant anionique. Plus particulièrement, l'agent mouillant peut être un ester de saccharose ou une composition comprenant un alkyle sulfate de sodium et un alcool.

[0048] Avantageusement, et de préférence, dans le composant détergent selon l'invention, ledit agent mouillant est non moussant à chaud et est de préférence choisi dans le groupe des sulfates d'alkyle sodique en C_6 à C_{10} , des sulfates d'alcool éthers en C_6 à C_{10} et des sulfonates d'alkylearyles en C_6 à C_{10} .

[0049] Plus particulièrement, selon la présente invention, ledit agent mouillant dudit composant détergent est le 2-éthylhexanol éthoxylé.

[0050] Le fait que l'agent mouillant soit non moussant à chaud permet une utilisation de la composition suivant l'invention pour le traitement d'outils médicaux présentant des tuyaux, comme par exemple les endoscopes. En effet, l'agent mouillant étant non moussant, ceci permet d'éviter la formation de mousse, sans altérer, bien au contraire, les performances tensioactives et/ou émulsionnantes de la composition selon l'invention. Il est bien entendu que l'apport d'une solution détergente efficace sans génération de mousse limite les étapes de rinçage, ce qui est particulièrement souhaitable, surtout pour les outils médicaux présentant des tuyaux qui peuvent ainsi être réutilisés rapidement pour une nouvelle intervention.

[0051] Dans une forme de réalisation selon l'invention, le composant détergent comprend une proportion d'agent mouillant comprise entre 1 et 15% en poids par rapport au poids total du composant détergent.

[0052] L'agent séquestrant est une substance chimique ayant la capacité à former des complexes avec des ions minéraux qu'il fixe sous une forme empêchant leur précipitation par les réactions habituelles. A titre d'exemple, l'agent séquestrant peut être l'acide éthylène-diamine-tétraacétique, le glucono-delta-lactone, le gluconate de sodium, le gluconate de potassium, le gluconate de calcium, l'acide citrique, l'acide phosphorique, l'acide tartrique, l'acétate de sodium, le sorbitol, un composé comportant un atome de phosphore. Préférentiellement, l'agent séquestrant peut être un oxyde de phosphore tel qu'un phosphonate, un phosphinate ou un phosphate ou leur mélange, ou un sel de celui-ci, une amine ou un oxyde d'amine portant au moins, dans sa structure, un groupement fonctionnel phosphine, oxyde de phosphine, phosphinite, phosphonite, phosphite, phosphonate, phosphinate ou phosphate, seul ou en combinaison, ou un sel de ceux-ci.

[0053] Avantagusement, l'agent séquestrant est une substance chimique compatible avec les substances utilisables dans les hôpitaux, par exemple, l'agent séquestrant est préférentiellement un agent non toxique pour la santé humaine.

[0054] Plus préférentiellement, l'agent séquestrant peut être un phosphonate ou un sel de celui-ci, une amine ou un oxyde d'amine comportant au moins, dans sa structure, un groupement fonctionnel phosphine, oxyde de phosphine, phosphinite, phosphonite, phosphite, phosphonate, phosphinate ou phosphate, seul ou en combinaison, ou un sel de ceux-ci. A titre d'exemple non limitatif, le phosphonate peut être de formule générale $R^1(R^2O)(R^3O)P=O$ dans lequel R^1 , R^2 et R^3 représentent indépendamment un groupe hydrogène, alkyle, alkyle substitué, alkyle-amino substitué ou non, aminoalkyl substitué ou non, aryle ou aryle substitué. A titre d'exemple non limitatif, l'amine ou l'oxyde d'amine peuvent comporter un, deux ou trois substituant(s) de formule générale CR^4R^5W dans laquelle R^4 et R^5 représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe hydrogène, alkyle, alkyle substitué, alkyle-amino substitué ou non, aminoalkyl substitué ou non, aryle ou aryle substitué, et W représente un groupe phosphonate, phosphinate ou phosphate.

[0055] L'agent séquestrant peut être sous la forme d'un sel de sodium, calcium, lithium, magnésium ou potassium ; préférentiellement, l'agent séquestrant peut être sous la forme d'un sel de sodium, calcium ou potassium.

[0056] De préférence, l'agent séquestrant est un agent qui peut être utilisé sans danger lors d'interventions médicales, c'est-à-dire que l'agent séquestrant ne présente aucun danger pour la santé, seul ou en association avec d'autres composants utilisés en milieu hospitalier.

[0057] Plus particulièrement, suivant l'invention, ledit agent séquestrant dudit composant détergent est un sel de potassium à base d'acide phosphonique modifié (N-oxyde ATMP).

[0058] Dans une forme de réalisation avantageuse selon l'invention, ledit au moins un composant détergent comprend une proportion d'agent séquestrant comprise entre 1 et 10% en poids par rapport au poids total du composant détergent, ce qui représente un optimum entre efficacité, stabilité et coût.

[0059] De préférence, ledit au moins un composant enzymatique comprend une proportion de protéase(s) comprise entre 10 et 50%, une proportion de laccase(s) comprise entre 5 et 35% et une proportion de polysaccharidase(s) comprise entre 5 et 20% en poids par rapport au poids total du composant enzymatique, les 100% du composant enzymatique étant éventuellement atteints à l'aide d'un excipient ou solvant conventionnel, par exemple un alcool.

[0060] Le composant enzymatique selon l'invention présente l'avantage d'être polyvalent, c'est-à-dire qu'il peut agir simultanément sur diverses souches bactériennes, ce qui est particulièrement avantageux en milieu hospitalier où de nombreuses souches bactériennes différentes se développent simultanément.

[0061] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le composant enzymatique peut contenir entre 1 et 10 protéases, préférentiellement entre 1 et 5 protéases, plus préférentiellement il peut contenir 2, 3, 4 ou 5 protéases.

[0062] Des exemples non limitatifs d'enzymes protéases appartenant à la classe EC 3.4 et susceptibles d'être utilisées dans l'invention sont les amino-peptidases (EC 3.4.11), les dipeptidases (EC 3.4.13), les dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14), les peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15), les sérine carboxypeptidases (EC 3.4.16), les métallo carboxypeptidases (EC 3.4.17), les cystéine carboxypeptidases (EC 3.4.18), les oméga peptidases (EC 3.4.19), les sérine endopeptidases (EC 3.4.21), les cystéine endopeptidases (EC 3.4.22), les aspartique endopeptidases (EC 3.4.23), les métallo endopeptidases (EC 3.4.24), les thréonine endopeptidases ((EC 3.4.25), et les endopeptidases appartenant à la classe EC 3.4.99.

[0063] Préférentiellement, les protéases appartiennent à la classe EC 3.4.21. Les protéases sont disponibles com-

mercialement et sous différentes formes incluant les poudres, les granulés, les suspensions, les solutions liquides.

[0064] Les laccases utilisées dans l'invention appartiennent à la classe EC 1.10.3.2. Les laccases sont des enzymes contenant du cuivre et ont pour fonction d'oxyder un substrat en présence d'oxygène. Plus spécifiquement, les laccases sont des oxydoréductases qui fonctionnent avec l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons.

[0065] La au moins une polysaccharidase utilisée dans l'invention est une enzyme ayant pour fonction de briser des liaisons au sein des polysaccharides. Préférentiellement, la au moins une polysaccharidase peut être une alpha-amylase, cellulase, hemi-cellulase, glucosidase, beta-glucanase ou pectinase.

[0066] Plus préférentiellement, la au moins une polysaccharidase peut être une alpha-amylase appartenant à la classe EC 3.2.1.1, ayant pour fonction de briser des liens (1-4)-alpha-glycosidiques dans des polysaccharides contenant trois unités ou plus alpha-(1-4)-D-glucose.

[0067] Préférentiellement, le composant enzymatique peut comprendre une proportion de laccase(s) approximativement de 30%, une proportion de protéase(s) approximativement de 30%, une proportion d'alpha-amylase(s) approximativement de 10% en poids par rapport au poids total du composant enzymatique, les 100% du composant enzymatique étant éventuellement atteints à l'aide d'un excipient ou solvant conventionnel.

[0068] Selon un autre mode de réalisation préféré, si le composant enzymatique comprend 2 protéases, la proportion de laccase(s) peut être approximativement de 30%, la proportion totale de protéases approximativement de 30%, la proportion d'alpha-amylase(s) approximativement de 10% en poids par rapport au poids total du composant enzymatique, les 100% du composant enzymatique étant éventuellement atteints à l'aide d'un excipient ou solvant conventionnel.

[0069] Par exemple, le rapport entre chaque protéase peut être compris entre 1:2 et 2:1, préférentiellement le rapport entre chaque protéase peut être de 1:1. Les enzymes présentes dans le composant enzymatique ont une action complémentaire sur le biofilm. Par exemple, la laccase présente une grande efficacité sur les souillures non attaquées par l'alpha-amylase ou les protéases. Comme mentionné plus haut, le composant enzymatique, de par la présence simultanée d'au moins trois types de d'enzymes, est polyvalent et peut agir en même temps sur divers types de biofilms produits par diverses souches bactériennes, ce qui est essentiel en milieu hospitalier.

[0070] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le composant enzymatique peut être une solution ou sous forme solide.

[0071] Préférentiellement, le composant enzymatique est une solution dont le pH peut être compris approximativement entre 8 et 10. Préférentiellement, le composant enzymatique est une solution aqueuse dont le pH peut être compris approximativement entre 8,5 et 9,5 ; plus préférentiellement le pH peut être approximativement de 9,0, et ceci pour préserver au maximum l'intégrité des enzymes.

[0072] Alternativement, le composant enzymatique peut être sous forme solide tel que par exemple sous forme d'un lyophilisat, de poudres, de granulés ou sous tout autre forme permettant la solubilisation dudit composant dans un solvant, puis il sera ultérieurement dissous dans ledit solvant. Le solvant peut être de l'eau ou une solution aqueuse, acide, basique, alcoolique, tamponnée ou neutre. Le composant enzymatique solubilisé pourra alors dans ce cas être ultérieurement dilué dans une solution aqueuse contenant éventuellement un ou plusieurs composés tels que par exemple des détergents pour former la solution de nettoyage.

[0073] Comme pour le composant enzymatique, le composant détergent peut être sous forme solide à dissoudre dans un solvant et/ou dans une phase aqueuse ou sous forme liquide.

[0074] Lorsqu'il est sous forme solide, il peut soit être mis directement en solution dans la solution formée par le composant enzymatique éventuellement déjà dilué dans la phase aqueuse, soit être mis en solution dans un solvant, préalablement à sa dilution dans la solution formée par le composant enzymatique et la phase aqueuse, ou dans la phase aqueuse directement, avant la dilution du composant enzymatique.

[0075] Lorsque le composant détergent est sous forme liquide, les 100% du composant détergent sont éventuellement atteints généralement à l'aide d'eau et, préalablement à l'application sur le biofilm, il sera dilué dans une phase aqueuse, contenant éventuellement déjà le composant enzymatique.

[0076] Eventuellement, selon le procédé de la présente invention, le pH de ladite solution est ajusté à une valeur de pH comprise entre 6,5 et 7,5, plus particulièrement autour de 7.

[0077] Alternativement, ladite composition peut être sous forme solide puis être dissoute avant utilisation dans un solvant afin d'obtenir, lorsqu'elle sera diluée dans une phase aqueuse avant application sur un biofilm, une solution dont le pH est compris approximativement entre 7 et 8. Dans une variante avantageuse selon l'invention, la composition est une solution prévue pour, lorsqu'elle est diluée dans une phase aqueuse avant application sur le biofilm, former une solution présentant un pH compris approximativement entre 6,5 et 7,5, plus particulièrement d'environ 7. De cette façon, le pH de la solution de la composition est particulièrement approprié à l'action du composant enzymatique, en particulier de la laccase.

[0078] Alternativement, ladite composition peut être sous forme solide puis être dissoute avant utilisation dans un solvant afin d'obtenir une solution qui sera ensuite diluée dans une phase aqueuse pour obtenir une solution de nettoyage dont le pH est compris approximativement entre 6,5 et 7,5, de préférence d'environ 7.

[0079] Selon le procédé de la présente invention, l'entièreté de la matrice des biofilms est éliminée, le traitement de

surface selon l'invention ne laissant subsister que des bactéries « nues », c'est-à-dire des bactéries dépourvues de toute protection et qui peuvent ainsi être facilement éliminées en totalité lors d'une utilisation ultérieure d'un biocide, comme expliqué ci-après après rinçage de la composition.

[0080] Comme mentionné plus haut, la composition suivant l'invention comprend un composant détergent qui favorise l'action des enzymes en leur permettant d'atteindre rapidement les couches inférieures des biofilms et pas uniquement leur couche supérieure. Les enzymes peuvent donc agir très rapidement sur l'ensemble de la structure des biofilms et ainsi mettre toutes les bactéries à nu non seulement à la surface des biofilms mais aussi au niveau des couches inférieures qui les constituent.

[0081] Les figures 1a à 1f illustrent les colorations obtenues (les zones entourées sont des zones présentant une coloration bleue) lors de l'utilisation d'un kit de détection de la présence de biofilm pour évaluer l'efficacité des techniques de nettoyage sur des râpes à pores étroits après pré-nettoyage (1a), après nettoyage dans une solution d'Aniosyme® (1b) et après nettoyage dans une solution de trempage suivant l'invention (1c) mais aussi pour des râpes à pores larges après pré-nettoyage (1d), après nettoyage dans une solution d'Aniosyme® (1e) et après nettoyage dans une solution de trempage suivant l'invention (1f).

[0082] Les figures 2a à 2f illustrent les colorations obtenues (les zones entourées sont des zones présentant une coloration bleue) lors de l'utilisation d'un kit de détection selon le brevet EP 2537601 de la présence de biofilm pour évaluer l'efficacité des techniques de nettoyage sur des râpes après pré-nettoyage (2a), après nettoyage dans une solution de trempage suivant l'invention (2b), après nettoyage dans une solution de trempage suivant l'invention et brossage (2c), après nettoyage dans une solution d'Aniosyme® (2d), après nettoyage dans une solution d'Aniosyme® et brossage (2e) et après nettoyage dans une solution d'Aniosyme® et brossage puis nettoyage dans une solution de trempage suivant l'invention et brossage (2f).

Exemples

Exemple 1 - Nettoyage d'instruments médicaux par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention - analyses ATP-métriques

[0083] Des essais ont été réalisés afin de déterminer si le procédé suivant l'invention permet d'éliminer efficacement les biofilms présents sur des instruments médicaux par trempage dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention.

[0084] Cette solution aqueuse de trempage a été préparée par dilution d'un premier produit comprenant un composant détergent comprenant un agent séquestrant, un agent mouillant et un agent dispersant et d'un deuxième produit comprenant un composant enzymatique comprenant au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase, dans de l'eau de distribution à 45°C de telle sorte que la solution aqueuse de trempage comprend une concentration de 0,25% (v/v) dudit premier produit et une concentration de 0,1% (v/v) dudit deuxième produit.

[0085] Préalablement au trempage des instruments dans la solution de trempage, ces derniers ont été lavés au laveur-désinfecteur de telle sorte à être prêts à l'emploi selon les procédures et les normes d'application dans les hôpitaux.

[0086] Des analyses ATP-métriques, afin de mesurer la présence d'Adénosine TriPhosphate, ont été effectuées pour déterminer :

- la quantité de molécules d'ATP sur la surface des instruments médicaux avant nettoyage avec la solution aqueuse de trempage suivant l'invention,
- la quantité de molécules d'ATP dans la solution aqueuse de trempage directement suite à l'immersion des instruments médicaux (c'est-à-dire avant le nettoyage par trempage à proprement parlé) dans la solution aqueuse de trempage, et
- la quantité de molécules d'ATP dans la solution aqueuse de trempage après 30 minutes de trempage des instruments médicaux dans la solution aqueuse de trempage.

[0087] La quantité de molécules d'ATP à la surface des instruments médicaux a été déterminée par écouvillonnage de la surface des instruments avant d'appliquer le protocole d'analyse de la méthode ATP Testing proposée par 3M™ (3M Clean-Trace). Cette technique d'analyse permet de mesurer une quantité de lumière produite (URL) qui est directement proportionnelle à la quantité d'énergie biologique présente dans la solution analysée, c'est-à-dire à la quantité (concentration) de microorganismes dans la solution analysée. La mesure de la quantité de lumière émise permet donc de mettre en évidence et de quantifier la présence de molécules d'ATP et donc de déterminer la quantité (concentration) de microorganismes dans la solution analysée (puisque l'ATP est une molécule essentielle à la vie microbienne). Par conséquent, cette technique d'analyse permet de déterminer dans quelle mesure la solution aqueuse de trempage suivant l'invention permet d'éliminer les biofilms pour permettre un accès aux microorganismes dont la quantité est mesurée par ATP-métrie.

EP 2 789 682 A1

[0088] Les résultats obtenus ont été interprétés sur base du tableau 1 suivant et sont présentés au tableau 2.

Tableau 1

Quantité de lumière produite (URL)	Interprétation
< 500 URL	Pas d'action requise : peu de bactéries
>500 URL et <999 URL	Action à entreprendre si zone à haut risque : bactéries présentes
>1000 URL	Action à entreprendre : nombreuses bactéries présentes

Tableau 2

	ATP sur la surface avant nettoyage (URL)	ATP en solution dans la solution aqueuse de trempage suite à l'immersion (URL)	ATP en solution dans la solution aqueuse de trempage après nettoyage par trempage (URL)
Canule d'aspiration pour coelioscopie	309	non mesuré	non mesuré
Alésoir	1576	14	185
Râpe orthopédique pour hanches	235	non mesuré	non mesuré
Râpe orthopédique pour hanches : le pertuis	7	non mesuré	non mesuré
Canule de colonne	non mesuré	non mesuré	non mesuré
Canule ORL	non mesuré	non mesuré	non mesuré

[0089] Les analyses ATP-métriques ont permis de déterminer une quantité importante de biofilms (molécules d'ATP) pour l'alésoir avant nettoyage par trempage (1576 URL) tandis que de faibles niveaux d'encrassement (contamination par la présence de biofilms) ont été relevés pour les autres instruments médicaux qui n'ont par conséquent pas fait l'objet d'un nettoyage par trempage dans la solution aqueuse de trempage suivant l'invention. Les résultats obtenus avec l'alésoir permettent de constater que le niveau d'ATP mesuré directement après l'immersion de l'alésoir dans la solution de trempage est très faible (14 URL) mais que ce niveau augmente de façon significative après 30 minutes de trempage dans la solution de trempage. Ceci indique clairement qu'un trempage dans la solution de trempage suivant l'invention permet de décrocher les biofilms de la surface des instruments médicaux, en l'occurrence de l'alésoir dans le cas présent, ce qui permet d'accéder aux microorganismes.

Exemple 2 - Essais comparatifs de nettoyage d'instruments médicaux par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention et par autoclavage - analyses par utilisation d'un kit de détection

[0090] Des essais comparatifs ont été réalisés pour comparer, en terme d'élimination de biofilms, un nettoyage réalisé par trempage durant 30 minutes dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention (telle que décrite à l'exemple 1) à un nettoyage réalisé par autoclavage à 134°C durant 90 minutes (technique actuellement d'application en milieu hospitalier).

[0091] Préalablement à ces deux types de nettoyage, les instruments médicaux ont d'abord été pré-nettoyés dans un nettoyeur-désinfecteur de telle sorte à être prêts à l'emploi selon les procédures et les normes d'application dans les hôpitaux.

[0092] Pour mesurer l'efficacité de chacun de ces nettoyages, un kit de détection a été utilisé sur les surfaces des instruments médicaux pour mettre en évidence la présence ou l'absence de biofilms :

- avant nettoyage,
- après nettoyage par trempage dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention, et
- après nettoyage par passage à l'autoclave.

[0093] Le kit de détection est composé de deux produits, un réactif de coloration et un réactif de nettoyage. Le colorant

bleu présent dans le réactif de coloration adhère spécifiquement aux EPS (Extracellular Polymeric Substances) formant la matrice protectrice du biofilm. La surface à analyser est aspergée avec la solution de coloration. Après 5 minutes d'action sur la surface, l'excédent de la solution est absorbé. Ensuite la surface est rincée à l'aide de la solution nettoyante qui requiert un temps de pose de cinq minutes. La surface est enfin rincée à l'eau et est analysée. La présence ou l'absence de biofilm est démontrée par une couleur bleue plus ou moins foncée selon la quantité de biofilm existant sur la surface. Une coloration bleu intense indique une présence importante de biofilm.

[0094] Les résultats obtenus, en terme de coloration à la surface des instruments analysés, sont présentés au tableau 3 ci-dessous pour les instruments médicaux testés.

Tableau 3

	Après pré-nettoyage au nettoyeur-désinfecteur	Après trempage dans la solution de trempage suivant l'invention	Après autoclavage
Alésoir	coloration bleue intense	absence de coloration bleue	coloration bleue moyenne
Canule d'aspiration pour coelioscopie	coloration bleue intense	absence de coloration bleue	non mesuré
Râpe orthopédique	coloration bleue intense	absence de coloration bleue	coloration bleue moyenne
Canule ORL	coloration bleue intense	faible coloration bleue	non mesuré

[0095] Il ressort de ces essais que les instruments pré-nettoyés par passage dans un nettoyeur-désinfecteur comportent tous des biofilms (coloration bleue intense) et donc que cette technique actuelle de nettoyage d'application dans les hôpitaux laisse subsister des biofilms sur les instruments médicaux. Par contre, ces résultats indiquent clairement qu'un trempage dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention permet d'éliminer très significativement les biofilms à la surface des instruments médicaux, ce qu'un autoclavage ne permet pas puisqu'une coloration bleue est toujours relevée suite à ce type de nettoyage.

Exemple 3 - Essais comparatifs de nettoyage d'instruments médicaux par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention, par trempage dans une solution aqueuse d'Aniosyme® et par autoclavage - analyses ATP-métriques

[0096] Des essais comparatifs ont été réalisés pour comparer, en terme d'élimination de biofilms, un nettoyage réalisé par trempage durant 30 minutes dans une solution aqueuse suivant l'invention (telle que décrite et préparée à l'exemple 1), à un nettoyage réalisé par trempage durant 15 minutes dans une solution aqueuse d'Aniosyme® (solution prétendant éliminer les biofilms) à 0,5% préparée selon les prescriptions du fabricant et à un nettoyage réalisé par autoclavage à 134°C durant 90 minutes.

[0097] Préalablement à ces trois types de nettoyage, les instruments médicaux ont d'abord été pré-nettoyés dans un nettoyeur-désinfecteur de telle sorte à être prêts à l'emploi selon les procédures et les normes d'application dans les hôpitaux.

[0098] Suite aux trempages soit dans une solution aqueuse suivant l'invention, soit dans une solution aqueuse d'Aniosyme® suivant les prescriptions du fabricant, les instruments médicaux ont été rincés à l'eau claire mais également autoclavés.

[0099] Des analyses ATP-métriques, selon le protocole d'analyse de la méthode ATP Testing proposée par 3M™ (3M Clean-Trace), ont été effectuées pour mesurer :

- la quantité de molécules d'ATP à la surface des instruments médicaux avant nettoyage,
- la quantité de molécules d'ATP à la surface des instruments médicaux après 30 minutes de trempage dans la solution de trempage suivant l'invention et après autoclavage,
- la quantité de molécules d'ATP à la surface des instruments médicaux après 15 minutes de trempage dans la solution aqueuse d'Aniosyme® et après autoclavage, et
- la quantité de molécules d'ATP à la surface des instruments médicaux après autoclavage à 134°C durant 90 minutes.

[0100] Les résultats obtenus ont été interprétés selon les critères mentionnés au tableau 1 et sont présentés au tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

	ATP après pré-nettoyage au nettoyeur-désinfecteur (URL)	ATP après trempage dans la solution de trempage suivant l'invention et autoclavage (URL)	ATP après trempage dans une solution d'Aniosyme® et autoclavage (URL)	ATP après autoclavage (URL)
5	Alésoir	14	non mesuré	non mesuré
10	Canule 1	418,5	non mesuré	15
	Canule 2	476,5	non mesuré	non mesuré
	Canule 3		non mesuré	10
15	Râpe	14	non mesuré	non mesuré
	Pince à dents large droite	231	non mesuré	non mesuré
20	Pince à dente penchée	437	non mesuré	non mesuré
	Canule 2 (extérieur)	522	non mesuré	non mesuré
25	Canule ORL large	569,5	12	non mesuré
	Canule ORL fine	400	non mesuré	32
30	Canule d'aspiration pour coelioscopie	2487,5	9	non mesuré

[0101] Une valeur ATP très élevée (2487,5 URL) est observée pour la canule d'aspiration pour coelioscopie avant les nettoyages. Ceci indique une grande quantité de biofilms résiduels après un pré-nettoyage dans un nettoyeur-désinfecteur et donc que les instruments censés être prêts à l'emploi comportent malgré tout encore des biofilms protégeant des microorganismes potentiellement responsables des maladies nosocomiales.

[0102] Par contre, après le trempage dans la solution de trempage suivant l'invention, le niveau ATP (ou quantité de molécules d'ATP) descend à un niveau très bas (9 URL), indiquant un niveau de propreté élevé, correspondant à une réduction logarithmique de 1,6 Log des microorganismes protégés par les biofilms et responsables des maladies nosocomiales, c'est-à-dire à un pourcentage de réduction supérieur à 90% des microorganismes protégés par les biofilms. Des résultats similaires sont obtenus pour la canule ORL large pour laquelle une réduction logarithmique de 2,44 Log est notée, ce qui correspond à un pourcentage de réduction supérieur à 90% des microorganismes protégés par les biofilms. Les autres instruments analysés présentent des valeurs ATP faible à moyenne avant les nettoyages et n'ont donc pas été soumis à un nettoyage avec la solution de trempage suivant l'invention.

Exemple 4 - Essais comparatifs de nettoyage d'instruments médicaux par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention et par trempage dans une solution aqueuse d'Aniosyme® - analyses par utilisation d'un kit de détection

[0103] Des essais comparatifs ont été réalisés pour comparer, en terme d'élimination de biofilms, un nettoyage réalisé par trempage durant 30 minutes dans une solution aqueuse suivant l'invention (telle que décrite et préparée à l'exemple 1), à un nettoyage réalisé par trempage durant 15 minutes dans une solution aqueuse d'Aniosyme® (solution prétendant éliminer les biofilms) à 0,5% préparée selon les prescriptions du fabricant.

[0104] Préalablement à ces deux types de nettoyage, les instruments médicaux ont d'abord été pré-nettoyés dans un nettoyeur-désinfecteur de telle sorte à être prêts à l'emploi selon les procédures et les normes d'application dans les hôpitaux.

[0105] Un rinçage à l'eau claire des instruments a été effectué suite aux nettoyages par trempage.

[0106] Pour mesurer l'efficacité de chacun de ces nettoyages, un kit de détection tel que décrit à l'exemple 2 a été

utilisé sur les surfaces des instruments médicaux :

- avant nettoyage,
- après nettoyage par trempage durant 30 minutes dans une solution de trempage suivant l'invention, et
- après nettoyage par trempage durant 15 minutes dans une solution de trempage d'Aniosyme® selon les prescriptions du fabricant.

[0107] La présence ou l'absence de biofilm est démontrée par une couleur bleue plus ou moins foncée selon la quantité de biofilm existant sur la surface. Une coloration bleu intense indique une présence importante de biofilm.

[0108] Les résultats obtenus sont présentés au tableau 5 ci-dessous pour les instruments médicaux testés.

Tableau 5

	Après pré-nettoyage au nettoyeur-désinfecteur	Après trempage dans la solution de trempage suivant l'invention	Après trempage dans une solution d'Aniosyme®
Râpe orthopédique à pores étroits	coloration bleue intense (figure 1a)	faible coloration bleue (figure 1c)	coloration bleue intense (figure 1b)
Râpe orthopédique à pores larges	coloration bleue intense (figure 1d)	faible coloration bleue (figure 1f)	coloration bleue intense (figure 1e)
Pince d'orthodontie	coloration bleue intense	faible coloration bleue	coloration bleue intense
Canule d'aspiration pour coelioscopie	coloration bleue intense	faible coloration bleue	coloration bleue intense
Canule ORL (embout large)	coloration bleue intense	faible coloration bleue	coloration bleue intense

[0109] Il ressort de ces essais, et comme illustré aux figures 1a à 1f, que les instruments pré-nettoyés par passage dans un nettoyeur-désinfecteur comportent tous des biofilms (coloration bleue intense) et donc que cette technique actuelle de nettoyage d'application dans les hôpitaux laisse subsister des biofilms sur les instruments médicaux. Par contre, ces résultats indiquent clairement qu'un trempage dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention permet d'éliminer très significativement les biofilms à la surface des instruments médicaux, ce qu'un trempage dans une solution aqueuse d'Aniosyme® ne permet qu'en une moindre mesure.

Exemple 5 : Essais comparatifs de nettoyage d'instruments médicaux (râpes) par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention et par trempage dans une solution aqueuse d'Aniosyme® associés à une étape de brossage manuel - analyses par utilisation d'un kit de détection

[0110] Des essais comparatifs ont été réalisés pour comparer, en terme d'élimination de biofilms, un nettoyage réalisé par trempage durant 30 minutes dans une solution aqueuse de trempage suivant l'invention (telle que décrite à l'exemple 1) et associé à une étape de brossage manuel à un nettoyage réalisé par trempage durant 15 minutes dans une solution aqueuse d'Aniosyme® (solution prétendant éliminer les biofilms) à 0,5% préparée selon les prescriptions du fabricant et associé à une étape de brossage manuel.

[0111] Préalablement à ces deux types de nettoyage, les instruments médicaux (râpes) ont d'abord été pré-nettoyés dans un nettoyeur-désinfecteur de telle sorte à être prêts à l'emploi selon les procédures et les normes d'application dans les hôpitaux.

[0112] Pour mesurer l'efficacité de chacun de ces nettoyages, un kit de détection tel que décrit à l'exemple 2 a été utilisé sur les surfaces des râpes :

- avant nettoyage,
- après nettoyage par trempage durant 30 minutes dans une solution de trempage suivant l'invention,
- après nettoyage par trempage durant 30 minutes dans une solution de trempage suivant l'invention et brossage manuel,
- après nettoyage par trempage durant 15 minutes dans une solution de trempage d'Aniosyme® selon les prescriptions du fabricant,
- après nettoyage par trempage durant 15 minutes dans une solution de trempage d'Aniosyme® selon les prescriptions du fabricant et brossage manuel, et

- après un premier nettoyage par trempage durant 15 minutes dans une solution de trempage d'Aniosyme® selon les prescriptions du fabricant et brossage manuel suivi d'un deuxième nettoyage par trempage dans une solution de trempage suivant l'invention et brossage manuel.

[0113] Les résultats obtenus sont présentés au tableau 6 ci-dessous.

[0114] La présence ou l'absence de biofilm est démontrée par une couleur bleue plus ou moins foncée selon la quantité de biofilm existant sur la surface. Une coloration bleu intense indique une présence importante de biofilm.

Tableau 6

	(a) Après pré- nettoyage	(b) Après trempage suivant l'invention	(c) (b) + brossage	(d) Après trempage dans une solution d'Aniosyme ®	(e) (d) + brossage	(f) (c)+ (e)
Râpes pores larges	coloration bleue moyenne	faible coloration bleue	absence de coloration	coloration bleue moyenne	coloration bleue moyenne	absence de coloration
Râpes pores étroits	coloration bleue intense (figure 2a)	faible coloration bleue (figure 2b)	absence de coloration (figure 2c)	coloration bleue intense (figure 2d)	coloration bleue moyenne (figure 2e)	absence de coloration (figure 2f)

[0115] Ces résultats ainsi que les figures 2a à 2f montrent qu'un pré-nettoyage supposé fournir des râpes prêtes à l'emploi laisse subsister des biofilms (coloration moyenne à intense selon la taille des pores des râpes).

[0116] Par ailleurs, il ressort de ces essais qu'un nettoyage par trempage dans une solution aqueuse d'Aniosyme® ne permet pas non plus d'éliminer tout le biofilm présent (coloration moyenne à intense) même lorsqu'un brossage manuel est effectué (coloration moyenne).

[0117] Par contre, un trempage dans une solution de trempage suivant l'invention permet d'éliminer significativement les biofilms puisqu'une faible coloration bleue est observée suite à ce nettoyage.

[0118] De plus, si le trempage dans une solution de trempage suivant l'invention est associé à une étape de brossage manuel, le nettoyage selon l'invention permet d'éliminer totalement les biofilms de la surface des râpes. Le même constat peut être uniquement établi si un nettoyage avec une solution d'Aniosyme® associé à un brossage manuel est suivi d'un nettoyage par trempage dans une solution suivant l'invention associé à un brossage manuel.

[0119] Le fait que, sans l'étape de brossage manuel, le trempage dans une solution de trempage suivant l'invention laisse subsister une faible coloration bleue s'explique par l'action de la solution de trempage qui déstructure le biofilm mais sans toutefois le décoller totalement des surfaces. C'est pourquoi une étape de brossage manuel est particulièrement indiquée.

Exemple 6: Nettoyage d'endoscopes avec une solution de trempage suivant l'invention

[0120] Des endoscopes propres mais déclassés (non utilisés depuis plusieurs années) et non stérilisés ont été utilisés pour déterminer l'efficacité de la solution de trempage suivant l'invention pour le nettoyage des endoscopes.

[0121] Une première étape a consisté à réaliser une mise à blanc des endoscopes dans un lave endoscope selon un protocole et une procédure connue avec les solutions commerciales Soluscope E (solution enzymatique) à 0,5% et Soluscope D (solution désinfectante à base de glutaraldéhyde) selon les prescriptions du fabricant.

[0122] Une deuxième étape a porté sur la mise à blanc du lave endoscope avec une solution suivant l'invention (telle que décrite à l'exemple 1) en suivant le programme de lavage prévu à cet effet par le fabricant (cycle de 30 minutes : désinfection - rinçage - désinfection - vidange - rinçage - séchage).

[0123] Une troisième étape a porté sur le nettoyage des endoscopes dans le lave endoscope avec une solution suivant l'invention (telle que décrite à l'exemple 1) et avec une solution désinfectante commerciale (Soluscope D) suite aux deux étapes précédentes. Ce nettoyage dans le lave endoscope consiste en un cycle de 35 minutes comprenant les étapes séquentielles suivantes : test d'étanchéité - pré-nettoyage - nettoyage - rinçage - désinfection - rinçage - séchage.

a) analyses de la présence de biofilm suite à la première étape

[0124] Suite à la mise à blanc des endoscopes par nettoyage standard dans un lave endoscope, les analyses suivantes

ont été réalisées :

- analyse bactériologique de l'intérieur de la canule de biopsie de l'endoscope par écouvillonnage à l'aide d'une brosse à endoscope plongée ensuite dans de l'eau peptonée jusqu'à analyse au laboratoire par étalement sur milieu de culture non sélectif et par mesures Bart Test selon les recommandations du fabricant.
Ces analyses de l'endoscope mis à blanc ont permis de montrer que le nettoyage standard au lave endoscope ne donne pas lieu au développement de microorganismes sur les milieux de culture. Cependant, les Bart Test ont réagi positivement, ce qui indique quand même la présence de microorganismes vivants et donc de bactéries susceptibles de former des biofilms.
- analyse bactériologique du lave endoscope (grille d'évacuation, goulot d'évacuation, filtre) par écouvillonnage, les écouvillons obtenus étant conservés dans de l'eau peptonée jusqu'à analyse au laboratoire par étalement sur milieu de culture non sélectif, par analyse ATP-métrique (comme décrite aux exemples précédents) et par mesures Bart Test.

[0125] Les comptages des bactéries se développant sur boîtes de pétri ont permis de mettre en évidence une forte présence de microorganismes au niveau du goulot d'évacuation du lave endoscope (colonies de couleur rouge) ainsi qu'au niveau de la grille d'évacuation (colonie jaune-dorée) et du filtre (colonie rouge). Les analyses ATP-métriques ont quant à elles révélés une faible présence de microorganismes sur ces mêmes zones du lave endoscope (valeurs URL inférieures à 500).

[0126] Un repiquage des colonies se développant sur le milieu de culture non sélectif sur des milieux spécifiques (Petrifilm Staph Express 3M) a permis de déterminer que ces colonies sont formées par *Staphylococcus aureus*.

[0127] Les mesures Bart Test ont réagi positivement pour les prélèvements effectués au niveau de la grille d'évacuation et du filtre du lave endoscope.

[0128] Il ressort donc de ces analyses que tant les endoscopes mis à blanc que le lave endoscope utilisé pour réaliser cette mise à blanc selon les procédures actuelles comportent toujours des microorganismes susceptibles de former du biofilm et donc que ces procédures ne sont pas optimales.

b) analyse de la présence de biofilm suite à la deuxième étape

[0129] Suite à la mise à blanc du lave endoscope avec une solution de trempage suivant l'invention, une analyse bactériologique de l'eau de rinçage du lave endoscope a été réalisée par étalement sur milieu de culture et par mesures Bart Test.

[0130] Des colonies bactériennes ont été dénombrées sur le milieu de culture non sélectif (28 CFU/150µl) puis repiquées sur un milieu sélectif pour la croissance des staphylocoques, ce qui a permis d'établir la présence de *Staphylococcus aureus* dans les eaux de rinçage du lave endoscope suite au nettoyage avec la solution de trempage suivant l'invention. Les mesures Bart Test ont confirmé cette présence de bactéries dans les eaux de rinçage du lave endoscope.

[0131] Ces essais permettent de conclure que la solution de trempage suivant l'invention assure le décrochage des bactéries dans le lave endoscope, ce qui permet d'assurer, par la suite, un meilleur nettoyage des endoscopes, le lave endoscope ne constituant plus une source de contamination.

c) analyses de la présence de biofilm suite à la troisième étape

[0132] Suite au nettoyage avec la solution de trempage suivant l'invention, des endoscopes préalablement mis à blanc (selon la première étape) dans un lave endoscope préalablement mis à blanc (selon la deuxième étape) et à une désinfection (Soluscope D), des analyses bactériologiques de l'eau de rinçage du lave endoscope et des endoscopes ont été réalisées par étalement sur milieu de culture et par mesures Bart Test.

[0133] Des colonies bactériennes ont été dénombrées dans l'eau de rinçage suite au nettoyage des endoscopes avec la solution selon l'invention (colonies rouges, 32 CFU/150µl). Les bactéries formant ces colonies ont été identifiées comme étant des *Staphylococcus aureus*. Les mesures Bart Test ont également indiqué la présence de bactéries dans l'eau de rinçage.

[0134] Ceci indique que la solution de trempage suivant l'invention permet de décrocher des bactéries encore présentes dans les endoscopes et/ou dans le lave endoscope même lorsqu'ils ont été préalablement mis à blanc.

[0135] L'analyse des endoscopes, par écouvillonnage et étalement des écouvillons obtenus sur boîtes de pétri, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de bactéries. Par contre, les mesures Bart Test ont révélé la présence de bactéries au niveau des endoscopes même après lavage avec la solution de trempage suivant l'invention.

[0136] Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

Revendications

1. Procédé d'élimination de biofilms pour le nettoyage d'instruments médicaux, en particulier pour lutter contre les maladies nosocomiales, **caractérisé en ce qu'il** comprend une étape de traitement de surface pendant une période de temps prédéterminée avec une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique et une étape de rinçage et/ou de séchage de ladite surface.
2. Procédé d'élimination selon la revendication 1, ledit composant détergent comprenant un agent mouillant et un agent dispersant.
3. Procédé d'élimination selon la revendication 1 ou 2, ledit composant détergent comprenant en outre un agent séquestrant.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ledit au moins un composant enzymatique contenant par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce que** ladite étape de traitement de surface pour lutter contre les maladies nosocomiales comprend une étape d'élimination des biofilms permettant de réaliser un abattement logarithmique d'au moins 1 Log des microorganismes responsables des maladies nosocomiales.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce que** ladite étape de traitement de surface est réalisée par trempage pendant une période de temps prédéterminée comprise entre 20 minutes et 24 heures dans une solution de trempage comprenant ladite composition et une phase aqueuse de dilution préalablement formée.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, **caractérisé en ce que** ladite étape de traitement de surface par trempage est associée à une étape d'abrasion mécanique de ladite surface avec ladite solution de trempage, par exemple par brossage mécanisé ou manuel ou par traitement aux ultrasons.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce qu'il** comprend en outre une étape supplémentaire de traitement de ladite surface à l'aide d'un biocide.
9. Utilisation d'une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique, pour lutter contre les maladies nosocomiales par élimination de biofilms.
10. Utilisation d'une composition selon la revendication 9, ledit composant détergent comprenant un agent mouillant et un agent dispersant.
11. Utilisation d'une composition selon la revendication 9 ou 10, ledit composant détergent comprenant en outre un agent séquestrant.
12. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, ledit composant enzymatique contenant par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.
13. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, pour l'élimination de sources de contamination comprenant *Staphylococcus aureus* et/ou *Escherichia coli* et/ou *Pseudomonas aeruginosa*.
14. Utilisation d'une composition comprenant au moins un composant détergent et au moins un composant enzymatique, pour le traitement de surfaces, d'outils médicaux ou de sols afin de lutter contre les maladies nosocomiales par trempage.
15. Utilisation d'une composition selon la revendication 14, ledit composant détergent comprenant un agent mouillant et un agent dispersant.
16. Utilisation d'une composition selon la revendication 14 ou 15, ledit composant détergent comprenant en outre un agent séquestrant.

17. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, ledit composant enzymatique contenant par exemple au moins une protéase, au moins une laccase et au moins une polysaccharidase.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Fig. 1c



Fig. 1f



Fig. 1b



Fig. 1e



Fig. 1a



Fig. 1d

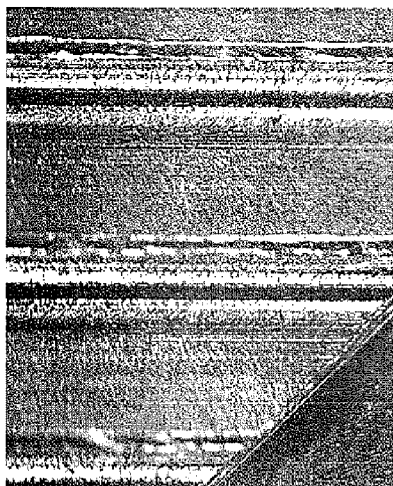


Fig. 2c

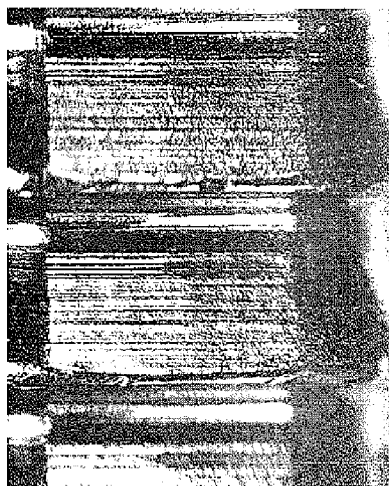


Fig. 2f

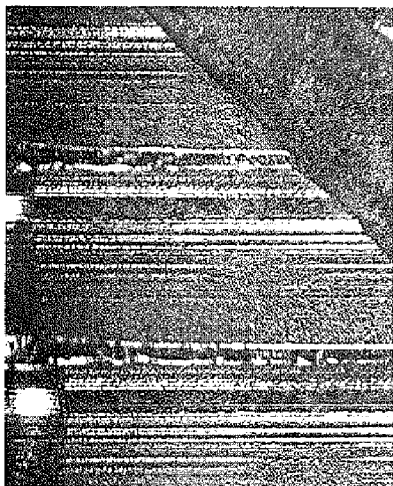


Fig. 2b



Fig. 2e



Fig. 2a

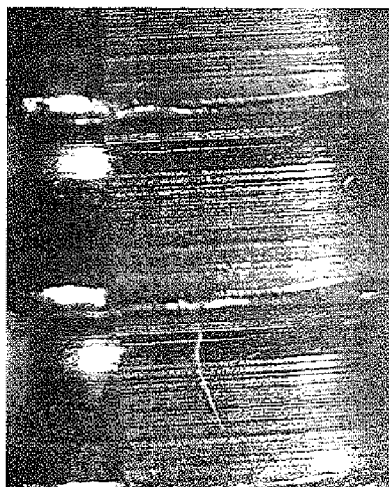


Fig. 2d



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 13 16 3533

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	EP 2 243 821 A1 (REALCO SA [BE]; AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 27 octobre 2010 (2010-10-27)	1-4,6	INV. C11D11/00 C11D3/48 C11D3/386
Y	* alinéas [0021], [0001]; revendications 1-10 *	1-17	
X	FR 2 846 665 A1 (MARION KARINE [FR]; SANCHEZ THIERRY [FR]) 7 mai 2004 (2004-05-07)	1,4,5,9,12,14,17	
Y	* page 1, ligne 5-19 * * page 19, ligne 4-7 * * revendications 1-12 *	1-17	
X	WO 01/76647 A1 (NOVAPHARM RES AUSTRALIA [AU]; SAVA ALEX [AU]; KRITZLER STEVEN [AU]) 18 octobre 2001 (2001-10-18)	1-6,8-17	
	* page 3, ligne 7-25; revendications 1-32 *		
	* page 4, ligne 23-25 *		
	* page 10, ligne 5 - ligne 20; exemples 3, 4 *		
	* page 19, ligne 29-33 *		
	* page 21; tableau 1 *		
X	EP 2 316 465 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 4 mai 2011 (2011-05-04)	14,15	
	* alinéas [0024], [0025], [0031], [0032], [0041], [0048], [0049]; revendications 15, 18 *		
X	WO 2010/080830 A1 (CUREMARK LLC [US]; FALLON JOAN M [US]; HEIL MATTHEW [US]; FALLON JAMES) 15 juillet 2010 (2010-07-15)	1,4,5,9,12-14,17	
	* page 42; revendications 22-25, 29-31 *		
	----- -/--		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
La Haye		6 septembre 2013	Loiselet-Taisne, S
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 (P04C02)



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 13 16 3533

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
T	Anonyme: "Les sangsues - Biologie", RICARIMPEX, Les sangsues médicinales 31 août 2012 (2012-08-31), XP002712416, Extrait de l'Internet: URL:http://sangsue-medicinale.com/les-sangsues/biologie/ [extrait le 2013-09-03] -----	17	
A	WO 98/26807 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]) 25 juin 1998 (1998-06-25) * page 19, ligne 1-12; revendications 1-12 * -----	9,13,14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche La Haye		Date d'achèvement de la recherche 6 septembre 2013	Examineur Loiselet-Taisne, S
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 (P04C02)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 13 16 3533

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne 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.

06-09-2013

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2243821	A1	27-10-2010	AUCUN	
FR 2846665	A1	07-05-2004	AT 443124 T	15-10-2009
			AU 2003288351 A1	07-06-2004
			CA 2501589 A1	21-05-2004
			CN 1708578 A	14-12-2005
			EP 1556466 A1	27-07-2005
			FR 2846665 A1	07-05-2004
			JP 2006504835 A	09-02-2006
			WO 2004041988 A1	21-05-2004
WO 0176647	A1	18-10-2001	AR 035569 A1	16-06-2004
			BR 0110145 A	07-01-2003
			CA 2403920 A1	18-10-2001
			CN 1422165 A	04-06-2003
			EP 1294410 A1	26-03-2003
			JP 2003530447 A	14-10-2003
			NZ 521495 A	30-04-2004
			TW 491713 B	21-06-2002
			US 2004029752 A1	12-02-2004
			US 2004209790 A1	21-10-2004
			WO 0176647 A1	18-10-2001
EP 2316465	A1	04-05-2011	CN 102753202 A	24-10-2012
			EP 2316465 A1	04-05-2011
			EP 2488216 A1	22-08-2012
			US 2012251625 A1	04-10-2012
			WO 2011045427 A1	21-04-2011
WO 2010080830	A1	15-07-2010	AU 2010203709 A1	21-07-2011
			CA 2747611 A1	15-07-2010
			CN 102300989 A	28-12-2011
			EP 2373791 A1	12-10-2011
			GB 2480772 A	30-11-2011
			JP 2012514602 A	28-06-2012
			KR 20110127140 A	24-11-2011
			US 2011280853 A1	17-11-2011
			WO 2010080830 A1	15-07-2010
WO 9826807	A1	25-06-1998	AT 207367 T	15-11-2001
			AU 5310298 A	15-07-1998
			CA 2275157 A1	25-06-1998
			DE 69707701 D1	29-11-2001
			DE 69707701 T2	01-08-2002
			EP 0946207 A1	06-10-1999
			ES 2167022 T3	01-05-2002

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

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 13 16 3533

5

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne 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.

06-09-2013

10

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		JP 4191253 B2	03-12-2008
		JP 2001508677 A	03-07-2001
		PT 946207 E	29-04-2002
		US 6100080 A	08-08-2000
		WO 9826807 A1	25-06-1998

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EPO FORM P0460

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

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 2012048757 A [0006]
- EP 2537601 A [0082]