

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 844 807

②① N° d'enregistrement national : **02 11718**

⑤① Int Cl⁷ : C 12 Q 1/14, G 01 N 33/58

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 23.09.02.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.03.04 Bulletin 04/13.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RAMBACH ALAIN — FR et LE COUS-
TUMIER ALAIN — FR.

⑦② Inventeur(s) :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROCÉDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE.

⑤⑦ L'invention se rapporte à un nouveau milieu solide de
détection de microorganismes résistants à la pénicilline,
dans lequel sont présents un antibiotique choisi dans le
groupe des céphalosporines notamment de seconde ou
troisième génération, et un agent chromogène portant un
chromophore libéré après hydrolyse avec une enzyme active
chez lesdits microorganismes.

FR 2 844 807 - A1



L'invention se rapporte à un nouveau milieu gélifié de détection de
5 microorganismes résistants à la méticilline, dans lequel sont présents un
antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou
troisième génération, et un agent chromogène portant un chromophore libéré après
hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

La détection systématique des *Staphylococcus aureus* résistants à la
10 méticilline (aussi écrite méthicilline) (MRSA) est importante.

En effet, bien que les MRSA ne semblent pas plus virulents que les MSSA,
(Staphylocoques dorés sensibles à la méticilline), leurs infections sont plus difficiles
et onéreuses à traiter. Ceci est dû à ce que la méti-résistance confère la résistance à
toutes les bêta-lactamines et que cette résistance est très souvent associée à des
15 résistances à de nombreux autres antibiotiques antistaphylococciques majeurs (Lyon
et Skurry, Microbiol. Rev. 51 ; 88 – 134)

Pour cette détection on a parfois utilisé des milieux de croissance gélosés
supplémentés à la méticilline. Cette méthode est maintenant souvent abandonnée
car elle détecte mal certaines souches MRSA, en particulier des souches
20 hétérogènes dans lesquelles des populations bactériennes contiennent une
proportion très faible de bactéries franchement résistantes à la méticilline (dans
lesquelles 1 bactérie sur 10^4 ou 10^8 exprime la résistance). Cette méthode donne un
nombre important de résultats faux négatifs.

L'utilisation de milieux de croissance gélosés supplémentés à l'oxacilline est
25 fréquente mais, comme avec la méticilline, certaines souches sont difficiles à
détecter.

De plus, pour que ces antibiotiques (méticilline, oxacilline) fonctionnent à
peu près efficacement comme suppléments sélectifs, on est contraint de n'employer
que certains milieux de croissance. En conséquence les milieux proposés à
30 l'utilisateur sont par exemple des dérivés du Muller Hinton Agar ou du Mannitol
Salt Agar. Malheureusement pour l'utilisateur ces milieux sont souvent peu
discriminants pour l'espèce *S. aureus* ce qui diminue encore la sensibilité et la
spécificité.

On a proposé des milieux de croissance gélosés supplémentés à la tobramycine ou l'ofloxacine, soit dans des bases peu discriminantes (dérivées du Mannitol salt Agar par exemple), soit dans la base très discriminante du CHROMagar Staph aureus, mais la corrélation avec la résistance à la méticilline est médiocre d'où un excès de faux positifs et de faux négatifs.

On utilise aussi la méthode de diffusion sur gélose, par exemple la gélose Mueller Hinton, qui consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre, qui reflète la valeur de la CMI.

La présente invention se rapporte à un milieu de culture gélosé permettant de détecter les microorganismes résistants à la méticilline, et en particulier les staphylocoques, notamment les staphylocoques dorés, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, on utilise les capacités discriminantes des milieux chromogènes, en combinaison avec les propriétés des antibiotiques de la famille des céphalosporines de 2^{ème} ou 3^{ème} génération, qui permettent de détecter les microorganismes résistants à la méticilline.

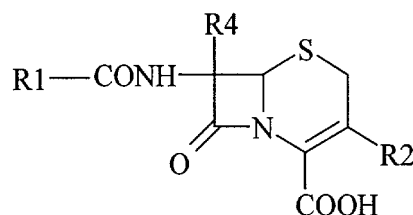
L'invention se rapporte donc à un milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, au moins un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

Les milieux de culture selon l'invention permettent une détection directe des microorganismes résistants à la méticilline, en raison de leur croissance sur le milieu selon l'invention et de la présence de(s) l'agent(s) chromogène(s), permettant de définir la nature du microorganisme. On n'a donc pas besoin d'étape supplémentaire de confirmation de la nature des microorganismes poussant sur le milieu selon l'invention.

Les milieux selon l'invention permettent la détection de bactéries résistantes à la méticilline, à partir d'un inoculum strié sur boîte, alors que la majorité des

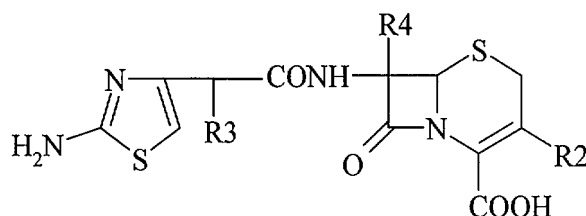
méthodes de l'art antérieur utilisent un dépôt d'environ 10^4 à 10^5 bactéries sur la gélose. On peut utiliser les milieux selon l'invention directement à partir d'un prélèvement à partir d'un patient, ou après une phase d'enrichissement.

- Par céphalosporine de seconde ou troisième génération, on entend désigner
 5 les antibiotiques de la famille des céphalosporines, présentant une formule dérivée de la formule (I) suivante :



- dans laquelle R2 est un groupement H, acétoxy-méthyle, éthyl-thiotétrazole, diméthyl-amino-éthyl-thiotétrazole, triazine, acétamino-pyridine (pyridinium), ou
 10 pyridinium substitué par un groupement carbamoyl, cyclo-pento-pyridinium, thiométhyl-acétoxy-thiazole, et R1 est un hétérocycle amino-2-thiazole, une α -pipérazine-dione, un α -sulfo-phényle..

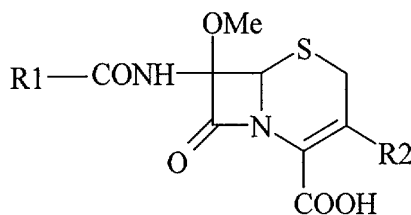
En particulier, on entend les composés présentant une formule



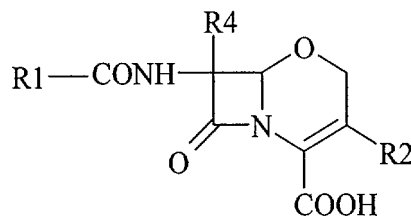
- 15 dans laquelle R3 est un groupement H ou un groupement α -méthoxy-imino.

Dans un cas particulier, le groupement R4 est un hydrogène.

Les céphamycines sont des composés dans lesquels le groupement R4 est un radical α -méthoxy, protégeant le noyau β -lactame de l'hydrolyse par les β -lactamases.



Les oxacephems sont des composés dans lesquels l'atome soufre du noyau céphem est remplacé par un atome d'oxygène, et sont considérés comme dérivés de la formule (I) présentée plus haut.



5 En général, pour ces composés, le groupement R4 est un α -méthoxy.

Une définition des céphalosporines ainsi envisagées peut être trouvée dans Binger (Mécanisme d'Action des Bêta-lactamines, (de la structure bactérienne à la structure de la molécule), 1986 Roussel (Paris) éditeur, chapitre III pages 47-62, et chapitre IV pages 63-68), et dans l'ouvrage de Richmond (Beta-lactam antibiotics
10 (the background to their use as therapeutic agents), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 éditeur, 1981, chapitre 3 pages 55-65).

A titre accessoire, on peut noter que les céphalosporines de seconde
15 génération présentent un meilleur effet que les céphalosporines de première génération contre les bactéries Gram négatives et résistent mieux à la dégradation par les β -lactamases, les céphalosporines de troisième génération présentant un spectre d'effet encore plus large vis-à-vis des bactéries Gram négatives.

Parmi les céphalosporines de seconde et troisième génération, on peut citer : loracarbef, cefaclor, cefuroxime, cefprozil, cefoxitin (cefoxitan), cefamandole,
20 cefotian, cefotetan, cefmetazole, cefocinide, ceforanide, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefmenoxime, cefodizime, cefoperazone, cefepime, cefpirome, cefsulfonide, cefetamete, ceftibutene, moxalactam, latamoxef, notamment sous forme de sels (sodiques). L'homme du métier peut obtenir des listes de tels composés, notamment sur Internet au site
25 www.biam2.org ou www.fpnotebook.com.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefamandole.

Dans un autre mode de réalisation, ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines (cefoxitine, cefotetan, cefmetazole, cefbupérazone, cefminox) et des oxacephems (moxalactam ou latamoxef).

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est la cefoxitine.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefmetazole.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le moxalactam.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefotetan.

- 5 Dans un mode de réalisation préféré, lesdits microorganismes sont des staphylocoques, et on utilise préférentiellement un agent chromogène choisi dans le groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, ainsi que décrit dans la demande WO 00/53799.

- 10 Les milieux de culture de *S. aureus* sont connus et décrits notamment dans le manuel "Oxoïd Unipath Limited", Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, Angleterre. Il peut s'agir, par exemple de "Nutrient Agar Oxoïd CM3", milieu essentiellement à base d'extraits de levure, de peptone et d'agar.

- 15 Dans un mode de réalisation préféré, ledit milieu de culture contient à la fois du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.

- 20 Dans un mode de réalisation particulier, le milieu de culture selon l'invention comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

- 20 Dans un mode de réalisation particulier, ledit milieu contient en outre de la déféroxamine. La déféroxamine permet en effet d'inhiber *Staphylococcus epidermis* sans inhiber *Staphylococcus aureus*, la concentration mise en oeuvre sera de préférence comprise entre 0,01 et 0,10 g/l.

- 25 Dans un mode de réalisation, le milieu selon l'invention contient également un antibiotique glycopeptide choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la teicoplanine et l'avoparcine et leurs mélanges, afin de détecter les microorganismes résistants à la fois à la méticilline et à la vancomycine. On peut utiliser environ de 5 mg/l à 50 mg/l de ces antibiotiques, plus particulièrement de 5 mg/l à 30 mg/l, de 10 mg/l à 30 mg/l, environ 25 mg/l.

- 30 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une forte charge osmotique dans le milieu de culture. Ainsi, contrairement aux milieux de détection de staphylocoques dorés résistants à la méticilline, utilisant l'oxacilline comme antibiotique, dans lesquels on ajoute du

chlorure de sodium, le milieu de culture de l'invention est également fonctionnel avec une concentration de sodium inférieure à 3 %, et égale à environ 2-2,5 %. Les conditions d'incubation peuvent être adaptées en fonction de la quantité de chlorure de sodium dans le milieu (durée d'incubation, température plus ou moins élevée...).

5 La concentration en antibiotique dans le milieu selon l'invention est de préférence comprise entre 0,5 et 50 mg/l, de préférence 1,5 et 30 mg/l, en particulier 1,5 et 15 mg/l. Quelques essais de routine permettent à l'homme du métier de l'ajuster en fonction de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée) des
10 microorganismes considérés pour l'antibiotique considéré.

Les milieux selon la présente invention contiendront, de préférence, de 0,01 à 0,50 g/l, notamment de 0,05 à 0,40 g/l de 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl
15 galactoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un milieu selon l'invention pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.

L'invention se rapporte également à un procédé de détection de
20 microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- inoculer un milieu selon l'invention avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- incubé ledit milieu dans des conditions permettant la croissance
25 desdits microorganismes,
- détecter, sur ledit milieu, la présence desdits microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

Les conditions d'incubation sont connues de l'homme du métier, et on utilise généralement une incubation à des températures comprises entre 25°C et
30 42°C, de préférence entre 30°C et 38°C.

Les durées d'incubation sont classiques (environ 24 heures).

Selon le microorganisme considéré, on peut utiliser une durée d'incubation plus courte ou plus longue, travailler dans des conditions aérobies ou anaérobies...

Le milieu selon l'invention permet notamment de détecter aisément les staphylocoques résistants à la méthycilline, en réduisant le temps d'analyse. La combinaison des antibiotiques choisis dans le cadre de l'invention et des agents chromogènes permet en effet de réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs, et de diminuer ainsi le besoin de réaliser des analyses complémentaires.

EXEMPLES

Exemple 1

Composition d'un milieu selon l'invention pour la détection de *S. aureus* résistants à la méticilline :

- Peptone et extrait de levure 40 g/l
- NaCl 25 g/l
- 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate 0,10 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside 0,05 g/l
- 15 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide 0,05 g/l
- Déféroxamine 0,050 g/l
- Agar 15 g/l

On ajoute, dans ce milieu, de l'oxacilline (6 mg/ml) ou de la cefoxitine (5 mg/l), après autoclavage, avant que le milieu ne soit solide (lorsqu'il est à une température d'environ 45 °C).

Ce milieu contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, permettant la détection spécifique des staphylocoques dorés (coloration mauve des colonies), ainsi que du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide, pour colorer les autres microorganismes pouvant être présents dans l'inoculum.

Exemple 2

Etude de la croissance de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sur le milieu CHROMagar Staph aureus (disponible par la société CHROMagar, 4, Place du 18 Juin 1940, 75006 Paris France) :

AR4295 MetiS : souche sensible à la méticilline

AR4297 MetiR : souche résistante à la méticilline (homogène)

MRhet : souche résistante à la méticilline (hétérogène)

Z252 : souche résistante à la méticilline, homogène, faible niveau de résistance

	AR4295 MetiS	AR4297 MetiR	MRhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus + oxacilline 6 mg/ml	-	+/-*	-	-
CHROMagar Staph aureus + Cefoxitine 5 mg/l	-	+	+	+

+ = croissance de colonies ; - = pas de croissance ; * = microcolonies

5

On inocule les boîtes de Pétri avec des cultures bactériennes en striant les boîtes, pour observer la croissance de bactéries isolées, après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les bactéries qui croissent donnent des colonies mauves sur le milieu de culture,

10 confirmant que les microorganismes sont des staphylocoques dorés.

Ainsi, le milieu selon l'invention permet de détecter directement les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, y compris les souches hétérogènes ou à faible niveau de résistance, du fait de la combinaison de la croissance des bactéries et de la

15 coloration des colonies.

Revendications

1. Milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines de seconde ou de troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.
5
2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits microorganismes sont des staphylocoques, en particulier des staphylocoques dorés.
10
3. Milieu selon la revendication 2, dans lequel ledit agent chromogène est choisi dans le groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est le cefamandole.
15
5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines et des oxacephems.
6. Milieu selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit antibiotique est choisi dans le groupe constitué de la cefoxitine, le cefmetazole, le moxalactam, et le cefotetan.
20
7. Milieu selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce qu'il contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.
25
8. Milieu selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.
9. Milieu selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, un antibiotique choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la teicoplanine, l'avoparcine, et leurs mélanges.
30
10. Milieu selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que la concentration en chlorure de sodium est inférieure à 3 %.

11. Milieu selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la concentration en antibiotique est comprise entre 0,5 et 50 mg/l.
12. Milieu selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration d'un agent chromogène est comprise entre 0,01 et 0,5 g/l.
- 5 13. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 12 pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.
14. Procédé de détection de microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :
- inoculer un milieu selon l'une des revendications 1 à 12
 - 10 avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
 - incubé ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits microorganismes,
 - détecter, sur ledit milieu, la présence desdits
 - 15 microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 627317
FR 0211718

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	AYERS L W ET AL: "CEFOTETAN A NEW CEPHAMYCIN COMPARISON OF IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY WITH OTHER CEPHEMS BETA LACTAMASE STABILITY AND PRELIMINARY RECOMMENDATIONS FOR DISC DIFFUSION TESTING" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 22, no. 5, 1982, pages 859-877, XP008017736 ISSN: 0066-4804 * le document en entier * * abrégé * * tableau 2 * * tableau 7 * * page 862, colonne de droite, ligne 11 - page 863, colonne de droite, ligne 10 * ---	1,2,4-6, 10-12	C12Q1/14 G01N33/58
X	JONES R N ET AL: "IN-VITRO ANTI MICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF CEFODIZIME HR-221 A NEW SEMI SYNTHETIC CEPHALOSPORIN" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 20, no. 6, 1981, pages 760-768, XP008017735 ISSN: 0066-4804 * le document en entier * * page 761, colonne de gauche, ligne 32 - colonne de droite, ligne 45 * * tableaux 2,4 * --- -/--	1,2,4, 10-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 juin 2003		Tuyman, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 627317
FR 0211718

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	KLUYTMANS JAN ET AL: "Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying Staphylococcus aureus and detecting methicillin resistance." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 40, no. 7, juillet 2002 (2002-07), pages 2480-2482, XP001157563 ISSN: 0095-1137 * le document en entier *	1-14	
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199511 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-077141 XP002243919 & JP 07 000181 A (KYOKUTO SEIYAKU KOGYO KK), 6 janvier 1995 (1995-01-06) * abrégé *	1-14	
A	MERLINO JOHN ET AL: "New chromogenic identification and detection of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 6, juin 2000 (2000-06), pages 2378-2380, XP001157564 ISSN: 0095-1137 * le document en entier *	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 juin 2003		Tuyman, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11-06-2003

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 7000181 A	06-01-1995	JP 3298932 B2	08-07-2002
