

PROTOCOLE STANDARD PRION 2018

Ce protocole sera révisé en fonction de l'évolution des connaissances.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
PHASE D'ÉTUDE <i>IN VIVO</i> SOUCHE 263K/HAMSTER SYRIEN DORÉ	5
1. Principes généraux	5
1.1 Support modèle	5
1.2 Réalisation d'une gamme contrôle	5
1.3 Produit ou procédé à tester	5
1.4 Traitements comparateurs et traitement témoin d'efficacité partielle	5
2. Mode opératoire	6
2.1 Préparation des homogénats et des supports	6
2.2 Application des traitements	7
2.3 Inoculation des animaux.....	8
2.4 Durée de l'étude	8
PHASE D'ETUDE <i>IN VIVO</i> SOUCHE DE PRION DE TYPE HUMAIN	9
1. Principes généraux	9
1.1 Support modèle	9
1.2 Réalisation d'une gamme contrôle	9
1.3 Produit ou procédé à tester	9
1.4 Traitements comparateurs et traitement témoin d'efficacité partielle	9
2. Mode opératoire	10
2.1 Préparation des homogénats et des supports	10
2.2 Application des traitements	11
2.3 Inoculation des animaux.....	12
2.4 Durée de l'étude	12
PHASE D'ETUDE <i>IN VIVO</i> RESULTATS ET INTERPRETATION	13
1. Données brutes	13
2. Expression des résultats et méthodologie statistique	13
3. Contenu et présentation des résultats	14
4. Interprétation des résultats de la phase d'étude <i>in vivo</i>	14
PHASE D'ETUDE <i>IN VITRO</i>	15
1. Principes généraux	15
2. Technique analytique	16
2.1 Généralités pour toutes les souches.....	16
2.2 Technique(s) analytique(s) pour les souches également testées dans l'étude <i>in vivo</i>	17
2.3 Technique(s) analytique(s) pour la (ou les) souche(s) additionnelle(s)	17
PHASE D'ETUDE <i>IN VITRO</i> RESULTATS ET INTERPRETATION.....	18

1. Données brutes	18
2. Expression des résultats	18
3. Interprétation des résultats	18
3.1 Aucun signal (support et effluent)	18
3.2 Signal dans l'effluent avec ou sans signal pour le support	18
3.3 Grille d'interprétation des résultats in vitro	19
 DETERMINATION DE LA PERFORMANCE DU PRODUIT OU DU PROCEDE TESTE	 20

Introduction

Le Protocole Standard Prion est un protocole opératoire devant permettre aux fabricants d'évaluer les performances de produits ou procédés en termes d'élimination et d'inactivation¹ des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) présents sur les dispositifs médicaux réutilisables après la réalisation d'actes invasifs.

L'évaluation des performances du produit, ou procédé, repose sur deux études *in vivo* permettant d'évaluer l'efficacité du procédé ou du produit en comparaison avec celle d'au moins deux des traitements comparateurs sous la forme de facteurs de réduction de l'infectiosité dans chaque étude.

En complément, des études *in vitro* sont conduites pour renseigner les mécanismes d'action du produit ou procédé, en permettant notamment de discriminer l'élimination de l'inactivation des protéines prion en réalisant une étude sur le support parallèlement à une étude dans l'effluent ou en solution.

Pour les études *in vivo*, comme pour les études *in vitro*, le protocole repose sur la contamination d'un support modèle par un homogénat de cerveau infecté par la souche définie.

Des essais sont effectués à l'aide d'un support modèle, un fil d'acier inoxydable, qui modélise les dispositifs médicaux thermorésistants ou thermosensibles. Ce support modèle est ensuite traité avec le produit ou procédé.

L'évaluation du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements de référence recommandés par l'OMS² et dénommés dans le protocole « traitements comparateurs » :

- L'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante.
- L'immersion dans l'eau de javel ou hypochlorite de sodium 20 000 ppm, pendant 1 heure à température ambiante.
- La stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes, est proposée comme traitement comparateur dans ce protocole pour comparer les performances des procédés physiques, bien que mentionnée par l'instruction DGS/R13/2011/449 du 1^{er} décembre 2011, comme responsable d'inactivation importante et non pas d'inactivation totale.

En complément, au moins un traitement réputé partiellement efficace est appliqué en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ce témoin interne d'efficacité partielle est basé sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs.

Les éléments de protocole à respecter ainsi que l'interprétation des résultats sont détaillés dans le présent document. L'ordre de présentation des tests *in vitro* et *in vivo* adopté ne préjuge en rien de la chronologie de réalisation de ces tests par les fabricants.

Afin de revendiquer l'inactivation des ATNC au regard de ce Protocole Standard Prion, le fabricant adresse un dossier à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et renseigne le formulaire de déclaration disponible sur le site internet de l'agence.

¹ Les dossiers de produits ou de procédés présentant des propriétés séquestrantes ou agrégantes de protéines ou de produits réputés fixant les protéines sur les surfaces ne sont pas recevables dans le cadre de ce Protocole Standard Prion.

² WHO Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies, 23-26 march 1999, Annex III "Decontamination methods for Transmissible Spongiform Encephalopathies"

Phase d'étude *in vivo* Souche 263K/Hamster syrien doré

La phase d'étude *in vivo* a pour objectif de quantifier la réduction de l'infectiosité et de la comparer à celle obtenue pour des traitements réputés d'efficacité maximale.

Une étude *in vivo* sur une souche animale 263K est requise.

Le modèle utilisé est le couple 263K/hamster.

1. Principes généraux

1.1 Support modèle

Les essais sont effectués à l'aide d'un support modèle : un fil d'acier inoxydable (qualité utilisée pour l'instrumentation chirurgicale) qui modélise les dispositifs médicaux. Ce support modèle, préalablement contaminé, est ensuite traité avec le produit ou procédé.

1.2 Réalisation d'une gamme contrôle

Une gamme contrôle est réalisée à partir d'homogénat de cerveau infecté par la souche choisie à différentes dilutions afin de contaminer les supports, qui seront inoculés par voie intra-cérébrale à l'animal. Sur la base des données brutes recueillies, un taux de transmission et une période moyenne d'incubation sont calculés pour chaque dilution de la gamme de contrôle ; la dose infectieuse 50% (DI50) adsorbée sur la surface des supports est calculée sur la base de ces taux de transmission.

La gamme de contrôle s'étendra en termes de dilutions jusqu'à la limite de détection du modèle.

1.3 Produit ou procédé à tester

Le protocole repose sur la contamination d'un support modèle par l'homogénat de la première dilution de la gamme contrôle. Le produit ou procédé à tester est appliqué selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical.

L'estimation de l'efficacité du produit ou du procédé testé repose d'une part sur la détermination du facteur de réduction RF (comparaison des résultats obtenus après traitement avec ceux obtenus pour les différentes dilutions de la gamme contrôle) qu'il induit et d'autre part sur la comparaison au RF obtenu avec les traitements comparateurs et les témoins d'efficacité partielle considérés.

1.4 Traitements comparateurs et traitement témoin d'efficacité partielle

Des traitements comparateurs réputés comme inactivants et un traitement d'efficacité partielle sont appliqués en parallèle sur des supports modèles contaminés par l'homogénat de la première dilution de la gamme contrôle.

Chacune des séries de résultats issues de ces 3 types de traitement appliqués en parallèle est indispensable à la validation de la solidité de l'étude.

1.4.1 Traitements comparateurs

Les traitements comparateurs, réputés comme inactivants des ATNC, retenus pour ce protocole sont :

- La stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes ;
- L'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante ;
- L'immersion dans l'eau de javel 20 000 ppm, pendant 1 heure à température ambiante.

L'évaluation du produit ou procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements comparateurs cités

Les deux traitements comparateurs retenus sont cohérents avec le produit ou procédé à tester (e.g. un produit alcalin se compare au moins à la soude tandis qu'un procédé à base de vapeurs d'agent actif se compare au moins à la stérilisation par vapeur d'eau.).

1.4.2 *Traitement témoin d'efficacité partielle*

Au moins un traitement réputé partiellement efficace est appliqué, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée, notamment la robustesse de l'étape de contamination des supports.

Ce traitement correspond à une situation dégradée (en termes de concentration ou de temps) des traitements comparateurs de référence. L'application d'un tel traitement sur les supports induit une réduction de la charge infectieuse supérieure de 2 à 5 logs, sans induire une inactivation totale. Les conditions exactes (concentration, temps, température, pH, degré chlorométrique) sont renseignées.

L'évaluation du produit ou procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins un traitement témoin d'efficacité partielle ;

2. Mode opératoire

2.1 *Préparation des homogénats et des supports*

2.1.1 Préparation des homogénats

✓ Homogénat négatif : il est constitué d'un homogénat à 10% (poids/volume) de cerveau sain préparé dans du PBS (1x, sans calcium ni magnésium, stérile).

✓ Homogénat positif : il est constitué d'un homogénat à 10% de cerveau infecté par la souche au stade terminal de la maladie préparé dans du tampon phosphate (PBS, 1x, sans calcium ni magnésium, stérile). Cet homogénat est aliquoté dans des tubes stériles et congelé à -80°C .

Cet homogénat positif :

- constitue le point 10^{-1} de la gamme
- est également utilisé pour contaminer les supports soumis aux traitements comparateurs, au(x) témoin(s) d'efficacité partielle et au produit ou procédé à tester.

✓ Les points suivants de la gamme contrôle (10^{-2} à 10^{-9}) : ils sont obtenus par des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$ de l'homogénat positif dans l'homogénat négatif (à pourcentage total de cerveau constant) et sont préparés extemporanément en triplicats (pour chaque point de gamme, 3 tubes sont préparés). A chaque dilution, l'échantillon est soigneusement homogénéisé par agitation. La préparation se fait à température ambiante.

Pour assurer la reproductibilité et la comparaison des résultats, il est choisi délibérément de privilégier la qualité de l'homogénéisation et une bonne dispersion de l'infectiosité. Ainsi, il est impératif de calibrer les homogénats à travers une aiguille émoussée, et de bien homogénéiser. La dilution dans un homogénat cérébral pour garder une composition des homogénats comparables est impérative.

2.1.2 Préparation et contamination des supports

✓ Description du support modèle et préparation

Acier inoxydable, qualité utilisée pour l'instrumentation chirurgicale, diamètre 0,16 mm à 0,3 mm, longueur de 5 mm .

Couper des fils d'une longueur de 5 mm, tous identiques.

Éliminer les résidus de fabrication.

✓ Contamination des supports

Disposer 200 μl de l'homogénat préparé comme ci-dessus dans des tubes contenant 5 supports au maximum. Placer le tube sous agitation lente pendant 1 heure à température ambiante (18°C – 25°C).

L'homogénéat est éliminé par pipetage.

Laisser sécher les supports sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) au minimum pendant 16 heures, à plat dans un contenant stérile. Les supports doivent être bien individualisés les uns des autres. Rincer pendant 5 minutes avec 1 ml de PBS sous agitation lente.

Laisser sécher sous un PSM pendant 1 heure, les supports devant bien être individualisés les uns par rapport aux autres.

Si les supports ne sont pas traités et/ou inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches. Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation.

2.2 Application des traitements

Les traitements comparateurs, le(s) témoin(s) d'efficacité partielle et le produit ou procédé à tester sont appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage et avant congélation éventuelle.

✓ Application des traitements comparateurs et témoins d'efficacité partielle **liquides**

Les traitements comparateurs et témoins d'efficacité partielle liquides sont réalisés dans de l'eau dure préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476.

Traitement comparateur soude 1N 1 heure (18°C-25°C)	Traitement comparateur eau de javel 20.000 ppm 1 heure (18°C-25°C)	Traitement témoin d'efficacité partielle	Produit ou procédé à tester
Préparer extemporanément la soude 1 N. Vérifier le pH	Préparer extemporanément l'eau de javel 20 000 ppm ou 2% de chlore actif (c.a.). Titre le chlore actif.	Préparer extemporanément la solution à la concentration définie. Vérifier le pH (soude) ou le titre en chlore actif	Appliquer selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical.
Placer les supports contaminés par 5 maximum dans des tubes			
Ajouter 1 mL de la solution considérée dans les tubes contenant les tiges contaminées à traiter.			
Maintenir le contact pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente.			
Le produit est éliminé par pipetage.			
Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois.			

✓ Application du traitement comparateur **par autoclavage** à 134°C pendant 18 minutes

Disposer les supports contaminés dans un récipient approprié (thermorésistant mais ne conduisant pas la chaleur), en veillant bien à ce qu'ils ne soient pas en contact les uns avec les autres. Fermer le récipient au moyen d'un couvercle non étanche laissant passer la vapeur. Appliquer le traitement par autoclavage à 134°C pendant 18 minutes, selon un cycle « solides ». Laisser refroidir.

✓ Après application, les étapes suivantes sont réalisées :

Les tubes sont laissés ouverts pendant au moins 2 heures sous un PSM pour obtenir un séchage parfait. Au besoin, congeler les supports à -80°C dans l'attente de l'inoculation. Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant l'inoculation.

Dans le cas d'un **procédé physique**, seules les trois dernières étapes (séchage / congélation / décongélation) sont réalisées après application.

2.3 Inoculation des animaux

Les études sont réalisées dans des locaux agréés pour l'expérimentation animale, présentant des niveaux de sécurité microbiologique compatibles avec l'utilisation de souches de prion. Les travaux d'expérimentation animale et d'entretien des animaux sont réalisés par du personnel qualifié dans le respect des règles éthiques et après accord des comités ad hoc.

Les animaux sont identifiés de manière individuelle (puce électronique, tatouage, ou bague) et hébergés selon les normes en vigueur.

Sous anesthésie générale, les animaux sont inoculés par voie intra-cérébrale à raison d'un support par animal, laissé à demeure pendant toute la durée de l'étude.

- ✓ Pour les supports contaminés avec les différentes dilutions de la gamme contrôle : un minimum de 4 animaux pour les trois premiers points de dilution, un minimum de 8 animaux (préférentiellement 12 pour renforcer la puissance statistique de l'étude) pour les autres dilutions.
- ✓ Pour les supports contaminés (homogénat positif à 10^{-1}) et traités : un minimum de 12 animaux inoculés par traitement, à raison de 4 animaux pour chacun des triplicats de traitement.

L'augmentation du nombre d'animaux inoculés avec les fortes dilutions augmente d'autant la probabilité de détecter des animaux positifs pour ces groupes, et par conséquent la sensibilité du modèle.

2.4 Durée de l'étude

La durée de l'étude pour le modèle hamster infecté par la souche 263K est comprise entre 4 et 6 fois la période d'incubation minimale observée dans le modèle expérimental.

Ainsi, pour le modèle de hamster infecté par la souche 263K, la période d'incubation minimale étant de 90 jours, la durée de l'étude est de 12 à 18 mois.

Phase d'étude *in vivo* Souche de prion de type humain

La phase d'étude *in vivo* a pour objectif de quantifier la réduction de l'infectiosité et de la comparer à celle obtenue pour des traitements réputés d'efficacité maximale.

Une étude *in vivo* sur une souche de prion de type humain
Le modèle souche/animal³ utilisé est représentatif d'une problématique de santé publique
significative (sporadique MM1, vCJD...).

1. Principes généraux

1.1 Support modèle

Les essais sont réalisés à l'aide d'un support modèle : un fil d'acier inoxydable (qualité utilisée pour l'instrumentation chirurgicale) qui modélise les dispositifs médicaux. Ce support modèle, préalablement contaminé, est ensuite traité avec le produit ou procédé.

1.2 Réalisation d'une gamme contrôlée

Une gamme contrôlée est réalisée à partir d'homogénat de cerveau infecté par la souche choisie à différentes dilutions afin de contaminer les supports, qui seront inoculés par voie intra-cérébrale à l'animal. Sur la base des données brutes recueillies, un taux de transmission et une période moyenne d'incubation sont calculés pour chaque dilution de la gamme de contrôle ; la dose infectieuse 50% (DI50) adsorbée sur la surface des supports est calculée sur la base de ces taux de transmission.

La gamme de contrôle s'étendra en termes de dilutions jusqu'à la limite de détection du modèle.

1.3 Produit ou procédé à tester

Le protocole repose sur la contamination d'un support modèle par l'homogénat de la première dilution de la gamme contrôlée. Le produit ou procédé à tester est appliqué selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical.

L'estimation de l'efficacité du produit ou procédé testé repose d'une part sur la détermination du facteur de réduction RF (comparaison des résultats obtenus après traitement avec ceux obtenus pour les différentes dilutions de la gamme contrôlée) qu'il induit et d'autre part sur la comparaison au RF obtenu avec les traitements comparateurs et les témoins d'efficacité partielle considérés.

1.4 Traitements comparateurs et traitement témoin d'efficacité partielle

Des traitements comparateurs réputés comme inactivants, un comparateur « eau » et un traitement d'efficacité partielle sont appliqués en parallèle sur des supports modèles contaminés par l'homogénat de la première dilution de la gamme contrôlée.

Chacune des séries de résultats issues de ces 4 types de traitement appliqués en parallèle est indispensable à la validation de la solidité de l'étude.

1.4.1 Traitements comparateurs

Les traitements comparateurs, réputés comme inactivants des ATNC, retenus pour ce protocole sont :

- La stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes ;
- L'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante ;
- L'immersion dans l'eau de javel 20 000 ppm, pendant 1 heure à température ambiante.

³ Les références bibliographiques relatives à la pertinence du modèle choisi seront indiquées

L'évaluation du produit ou procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements comparateurs cités

Les deux traitements comparateurs retenus sont cohérents avec le produit ou procédé à tester (e.g. un produit alcalin se compare au moins à la soude tandis qu'un procédé à base de vapeurs d'agent actif se compare au moins à la stérilisation par vapeur d'eau.).

1.4.2 *Traitement comparateur « eau »*

Le but du témoin d'efficacité partielle est de confirmer que la contamination de surface est suffisamment résistante pour ne pas être éliminée par un « simple rinçage », et donc risquer de valider un traitement non efficace.

Le traitement comparateur « eau » sera donc utilisé comme étalon de réduction de la charge infectieuse liée au simple rinçage à l'eau.

1.4.3 *Traitement témoin d'efficacité partielle*

Au moins un traitement réputé partiellement efficace est appliqué, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée, notamment la robustesse de l'étape de contamination des supports.

Ce traitement correspond à une situation dégradée (en termes de concentration ou de temps) des traitements comparateurs de référence. L'application d'un tel traitement sur les supports induit une réduction de la charge infectieuse supérieure de 1 à 4 logs par rapport à celle induite par le traitement « eau », sans induire une inactivation totale. Les conditions exactes (concentration, temps, température, pH, degré chlorométrique) sont renseignées.

L'évaluation du produit ou procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins un traitement témoin d'efficacité partielle lui-même confronté au comparateur « eau ».

2. Mode opératoire

2.1 *Préparation des homogénats et des supports*

2.1.1 Préparation des homogénats

✓ Homogénat négatif : il est constitué d'un homogénat à 10% (poids/volume) de cerveau sain.

✓ Homogénat positif : il est constitué d'un homogénat à 10% de cerveau infecté par la souche au stade terminal de la maladie.

Cet homogénat positif :

- constitue le point 10^{-1} de la gamme
- est également utilisé pour contaminer les supports soumis aux traitements comparateurs, témoins d'efficacité partielle et produit ou procédé à tester.

✓ Les points suivants de la gamme contrôle (étendue de la gamme de contrôle à expliciter) : ils sont obtenus par des dilutions successives de 10 en 10 de l'homogénat positif dans l'homogénat négatif (à pourcentage total de cerveau constant) et sont préparés extemporanément en triplicats, c'est-à-dire pour chaque point de gamme, 3 tubes sont préparés. A chaque dilution, l'échantillon est soigneusement homogénéisé par agitation. La préparation se fait à température ambiante.

Pour assurer la reproductibilité et la comparaison des résultats, il convient de privilégier la qualité de l'homogénéisation et une bonne dispersion de l'infectiosité. La dilution dans un homogénat cérébral pour garder une composition des homogénats comparables est impérative.

2.1.2 Préparation et contamination des supports

✓ Description du support modèle et préparation

Acier inoxydable, qualité utilisée pour l'instrumentation chirurgicale, diamètre 0,16 mm à 0,3 mm, longueur comprise entre 3 et 5 mm.

✓ Contamination des supports

Disposer l'homogénat préparé comme ci-dessus dans des tubes contenant 5 supports maximum. Placer le tube sous agitation lente 1 heure à température ambiante (18°C – 25°C).

L'homogénat est éliminé par pipetage.

Laisser sécher les supports sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) au minimum pendant 16 heures, à plat dans un contenant stérile. Les supports doivent être bien individualisés les uns des autres.

Rincer pendant 5 minutes sous agitation lente.

Laisser sécher sous un PSM pendant 1 heure, les supports devant bien être individualisés les uns par rapport aux autres.

Si les supports ne sont pas traités et/ou inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches. Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation.

2.2 Application des traitements

Les traitements comparateurs, le(s) témoin(s) d'efficacité partielle et le produit ou procédé à tester sont appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage et avant congélation éventuelle.

✓ Application des traitements comparateurs et témoins d'efficacité partielle **liquides**

Les traitements comparateurs et témoins d'efficacité partielle liquides sont réalisés dans de l'eau dure préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476.

Traitement comparateur soude 1N 1 heure (18°C-25°C)	Traitement comparateur eau de javel 20.000 ppm 1 heure (18°C-25°C)	Traitement comparateur « eau »	Traitement témoin d'efficacité partielle	Produit ou procédé à tester
Préparer extemporanément la soude 1 N. Vérifier le pH	Préparer extemporanément l'eau de javel 20 000 ppm ou 2% de chlore actif (c.a.). Titrer le chlore actif.	Préparer l'eau dure normée	Préparer extemporanément la solution à la concentration définie. Vérifier le pH (soude) ou le titre en chlore actif	Appliquer selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical.
Placer les supports contaminés par 5 maximum dans des tubes				
Ajouter 1 mL de la solution considérée dans les tubes contenant les tiges contaminées à traiter.				
Maintenir le contact pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente.				
Le produit est éliminé par pipetage.				
Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois.				

✓ *Application du traitement comparateur **par autoclavage** à 134°C pendant 18 minutes*

Disposer les supports contaminés dans un récipient approprié (thermorésistant mais ne conduisant pas la chaleur), en veillant bien à ce qu'ils ne soient pas en contact les uns avec les autres.
Fermer le récipient au moyen d'un couvercle non étanche laissant passer la vapeur.
Appliquer le traitement par autoclavage à 134°C pendant 18 minutes, selon un cycle « solides ».
Laisser refroidir.

✓ *Après application, les étapes suivantes sont réalisées :*

Les tubes sont laissés ouverts pendant au moins 2 heures sous un PSM pour obtenir un séchage parfait.
Au besoin, congeler les supports à -80°C dans l'attente de l'inoculation.
Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant l'inoculation.

Dans le cas **d'un procédé physique**, seules les trois dernières étapes (séchage / congélation / décongélation) sont réalisées après application.

2.3 Inoculation des animaux

Les études sont réalisées dans des locaux agréés pour l'expérimentation animale, présentant des niveaux de sécurité microbiologique compatibles avec l'utilisation de souches de prion. Les travaux d'expérimentation animale et d'entretien des animaux sont réalisés par du personnel qualifié dans le respect des règles éthiques et après accord des comités ad hoc.

Les animaux sont identifiés de manière individuelle (puce électronique, tatouage, ou bague) et hébergés selon les normes en vigueur.

Sous anesthésie générale, les animaux sont inoculés par voie intra-cérébrale à raison d'un support par animal, laissé à demeure pendant toute la durée de l'étude.

- ✓ Pour les supports contaminés avec les différentes dilutions de la gamme contrôle : un minimum de 4 animaux pour les trois premiers points de dilution, un minimum de 8 animaux (préférentiellement 12 pour renforcer la puissance statistique de l'étude) pour les autres dilutions. Le laboratoire en charge des tests s'assurera que le nombre d'animaux par point de dilution est suffisant et statistiquement représentatif en fonction du modèle afin d'assurer la validité de l'étude.
- ✓ Pour les supports contaminés (homogénat positif à 10^{-1}) et traités : un minimum de 12 animaux sera inoculé par traitement, à raison de 4 animaux pour chacun des triplicats de traitement.

L'augmentation du nombre d'animaux inoculés avec les fortes dilutions augmente d'autant la probabilité de détecter des animaux positifs pour ces groupes, et par conséquent la sensibilité du modèle.

2.4 Durée de l'étude

La durée minimale de cette étude in vivo est conforme à l'état de l'art pour le modèle souche/animal considéré.

Phase d'étude *in vivo* Résultats et interprétation

1. Données brutes

Les données brutes suivantes sont recueillies pour chaque animal qui doit être identifié individuellement :

- Numéro de l'expérience.
- Lignée d'animal utilisée.
- Fournisseur et statut sanitaire.
- Sexe.
- Date de naissance.
- Souche de prion inoculée.
- Date d'inoculation.
- Date du début des signes cliniques, établie grâce à une surveillance moyenne de 2 fois par semaine tout au long du monitoring des animaux, avec une description et un enregistrement des signes cliniques spécifiques des ESST⁴.
- Date du sacrifice de l'animal.
- Le cerveau de chaque animal est prélevé pour une recherche de la forme la PrP anormale par une méthode sensible et reconnue. Tous les animaux survivants au terme de l'expérimentation sont euthanasiés et analysés.

2. Expression des résultats et méthodologie statistique

L'analyse statistique de ces données est fondée sur l'approche « end-point titration ». Seul le statut final de l'animal (infecté / non infecté) à la fin de l'expérimentation sera considéré.

La durée de l'expérimentation est fixée a priori comme la durée de suivi des animaux. Le choix de cette durée doit être justifié, dans un souci de limiter au maximum les cas de PrPres négatifs (PrPres -) en raison d'une durée d'observation trop courte.

Le **statut final** est alors déterminé comme suit :

- 1) Les animaux dont le cerveau présente les caractéristiques biochimiques de la pathologie (PrPres +) sont considérés comme « infectés ».
- 2) Les animaux décédés au cours de l'étude mais dont le cerveau ne présentait aucune caractéristique de la pathologie (PrPres -) sont considérés comme non infectés au moment de leur décès (lié à une cause intercurrente) et sont éliminés de l'étude. En effet, il n'est pas possible de conclure quant à leur statut vis-à-vis de l'infection, ces animaux ayant potentiellement pu présenter les signes de l'infection postérieurement à cette date.
- 3) Les autres animaux, qui étaient donc à la fois vivants à la fin de l'expérience, et dont le cerveau ne présentait aucune caractéristique de la pathologie (PrPres -), sont considérés comme non infectés.

Un taux de transmission est ainsi établi d'une part pour chaque dilution de la gamme contrôle, et d'autre part pour chaque traitement testé dans l'expérience. Egalement, une période moyenne d'incubation est calculée pour chacun de ces groupes.

⁴ Les signes cliniques sont de cinq ordres :

- Troubles du comportement (excitabilité, troubles de la nidation et du toilettage),
- Perte du réflexe de positionnement visuel,
- Ataxie cérébelleuse,
- Démarche anormale,
- Prostration,
- Obésité puis amaigrissement,
- Paraplégie puis tétraplégie.

Pour la gamme contrôle, le mode de calcul de la dose infectieuse 50% (DI₅₀ i.e. 50% des animaux infectés au sein d'une population ou groupe d'animaux) repose sur l'analyse du statut final des animaux. La détermination de la DI₅₀ repose sur la réponse étudiée en tout-ou-rien (infecté/non infecté) comme par exemple, les méthodes de Spearman & Kärber, des Probits ou des Logits. L'estimation de la DI₅₀ est assortie de son intervalle de confiance à 95%.

L'efficacité du procédé ou produit testé est estimée en évaluant le facteur de réduction (RF) qu'il induit, sur la base de la comparaison des taux de transmission et des périodes d'incubation dans le groupe traité d'une part, avec les résultats obtenus pour les points de la gamme contrôle d'autre part. Selon la même méthode, les facteurs de réduction (RF) induits sont estimés pour chacun des traitements comparateurs et des témoins d'efficacité partielle appliqués.

Par ailleurs, un calcul précis de ce facteur de réduction ne peut être réalisé qu'en effectuant le rapport des DI₅₀ en présence et en absence du produit ou du procédé à tester. En cas d'un taux de transmission de 100% après traitement sur des supports contaminés avec l'homogénat positif 10⁻¹, la comparaison de ces DI₅₀ implique alors l'application du traitement à tester sur les différents points de gamme.

L'estimation des facteurs de réduction est assortie de son intervalle de confiance (IC) à 95%. Le produit ou procédé testé est mis en regard des performances obtenues avec les traitements comparateurs retenus.

3. Contenu et présentation des résultats

Pour être recevables, les résultats comportent les informations et les caractéristiques suivantes, *a minima* :

- Evaluation de la charge infectieuse apparente adsorbée sur le support, sous la forme d'une DI 50 % (avec son intervalle de confiance à 95 %). Cette charge infectieuse est suffisante pour permettre d'observer une mortalité à la dilution 10⁻⁶ pour le modèle 263K/Hamster syrien doré.
- Traitement(s) témoin(s) d'efficacité partielle : dans les groupes d'animaux inoculés avec les supports traités avec le(s) traitement(s) témoin(s) d'efficacité partielle, une réduction de l'infectiosité de l'ordre de deux à cinq logs sera observée (validation de la robustesse de la contamination).
- Traitement étudié : pour chaque produit ou procédé étudié, le taux de transmission est fourni, ainsi que les périodes d'incubation individuelles (une courbe de Kaplan-Meier pourra être proposée avec son intervalle de confiance à 95%, et mis en regard des courbes observées pour chaque point de dilution de la gamme). Ces comparaisons permettent d'estimer un facteur de réduction induit par le produit ou procédé à tester utilisé.

4. Interprétation des résultats de la phase d'étude *in vivo*

Les tests *in vivo* ont pour objectif de quantifier la réduction de l'infectiosité (RF) du produit ou procédé testé puis de comparer le RF avec les RF obtenus pour des traitements comparateurs réputés d'efficacité maximale c'est-à-dire inactivants totaux et du (des) traitement(s) témoin(s) d'efficacité partielle.

**Un produit ou procédé est réputé d'efficacité totale, dans le cadre de la phase « *in vivo* », lorsque son RF est, pour chacune des deux souches requises :
supérieur ou égal aux RF des 2 traitements comparateurs
ET
strictement supérieur aux RF du (des) témoin(s) d'efficacité partielle.**

Phase d'étude *in vitro*

Cette phase d'étude *in vitro* vient en complément de la phase d'étude *in vivo*.

Elle a pour objectif de renseigner sur les mécanismes d'action du produit ou procédé vis-à-vis des prions, et tout particulièrement de discriminer l'inactivation des ATNC, du simple décrochage du dispositif médical (ci-après dénommé élimination)

Dans l'étude *in vitro*, trois souches, a minima seront testées :

- la souche 263K,
- la souche de prion de type humain utilisée dans l'étude *in vivo*,
- une souche d'origine bovine ou humaine.

Des souches supplémentaires peuvent être testées selon la méthode *in vitro*, en particulier la réalisation d'essais sur une souche de variant paraît appropriée. Les souches d'origine humaine permettent de balayer un champ d'étude plus large. Le modèle utilisé pour caractériser ces souches garantira que ces souches sont aussi virulentes pour l'homme que les isolats d'origine.

1. Principes généraux

Pour l'approche *in vitro*, la méthodologie de l'étude est identique à celle utilisée pour la méthode *in vivo* utilisée pour la souche considérée, afin d'assurer une bonne corrélation entre les deux phases d'étude.

Les principes de la méthode *in vitro* sont identiques à ceux utilisés pour la méthode *in vivo*.

Comme pour la méthode *in vivo*, l'évaluation du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements pris comme comparateurs. Les deux traitements comparateurs retenus sont cohérents avec le produit ou procédé à tester.

En complément, au moins un traitement réputé partiellement efficace est appliqué en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ce traitement d'efficacité partielle est basé sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs, et il est adapté au modèle afin d'avoir une efficacité partielle par rapport à la gamme contrôle de l'essai. Ainsi, l'application de tels traitements induit une réduction d'infectiosité de l'ordre de deux à cinq logs.

**L'évaluation *in vitro* du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec :
au moins deux des traitements comparateurs
et au moins un traitement témoin d'efficacité partielle**

La réalisation de la gamme contrôle permet d'attester de la robustesse et de la sensibilité de la technique utilisée. La gamme de contrôle s'étend en termes de dilutions jusqu'à la limite de détection du modèle.

- Le support utilisé pour l'étude *in vitro*, le fil d'acier inoxydable est identique à celui utilisé pour l'étude *in vivo* ;
- Le mode de contamination des supports est identique à celui de la méthode *in vivo* ;
- Une gamme de contrôle réalisée dans les mêmes conditions que pour la méthode *in vivo* ;
- Même choix des 2 traitements comparateurs et du traitement témoin d'efficacité partielle ;
- Traitement comparateur « eau » ;
- Mêmes modalités d'application que dans l'étude *in vivo* pour le produit ou procédé à tester, les traitements comparateurs et les témoins d'efficacité partielle ;
- Description détaillée du recueil des effluents (liquides récupérés après l'application d'un traitement liquide sur le support contaminé et, le cas échéant, liquides de rinçage du support contaminé après traitements) ;
- L'étude des effluents comparativement aux supports est nécessaire pour interpréter les résultats et apprécier les phénomènes de décrochage pur, différents de l'inactivation.

2. Technique analytique

2.1 **Généralités pour toutes les souches**

Le principe retenu est celui d'une analyse biochimique visant à détecter la forme anormale de la PrP (seul marqueur spécifique des maladies à prions) **sur les supports** en comparaison d'une analyse en solution :

- Soit dans les effluents générés par le traitement des supports,
- Soit directement après contact du matériel infectieux avec le procédé ou produit à tester qui est appliqué selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical.

Cette analyse permet de qualifier la performance du produit ou du procédé en « éliminant », « inactivant » ou « non inactivant ».

La technique retenue est adaptée à la souche considérée, pour une même étude, plusieurs techniques analytiques peuvent donc être choisies.

Dans le cadre de cette approche *in vitro*, tous les détails nécessaires relatifs à la méthodologie utilisée sont fournis afin de permettre de juger de la pertinence de l'approche choisie et de la cohérence des résultats. Sont notamment renseignés :

- la description détaillée de l'analyse biochimique des supports et des effluents.
- les contrôles de spécificité et de sensibilité.

Remarques :

1. Généralement, les techniques utilisent une désorption de la PrP du support pour une analyse ultérieure. Cependant, l'utilisation d'une technique de détection directe de la PrP sur le support est envisageable, accompagnée du protocole de validation de la technique.
2. En cas de résultats discordants entre les études *in vivo* et *in vitro*, ou en cas de résultats difficiles à interpréter, pour être exploitables, les résultats *in vitro* issus de techniques analytiques utilisant la protéinase K (pK) feront état d'une manipulation sans traitement par la pK.

2.2 Technique(s) analytique(s) pour les souches également testées dans l'étude in vivo

La technique analytique retenue est adaptée à la souche et affiche un niveau de sensibilité correspondant à l'état de l'art. A ce jour les techniques existantes permettent un niveau de sensibilité minimum de 10^{-4} . Ce niveau de sensibilité est donc attendu.

2.3 Technique(s) analytique(s) pour la (ou les) souche(s) additionnelle(s)

La technique analytique retenue est adaptée à la souche considérée et affiche un niveau de sensibilité correspondant à l'état de l'art.

Concernant la (ou les) souche(s) additionnelle(s) testée(s) uniquement *in vitro*, celle(s)-ci ne faisant pas l'objet d'une étude in vivo, la technique analytique retenue fera appel à une technique d'amplification (PMCA, RT-QulC...) avec un niveau de sensibilité minimum de 10^{-6} .

Phase d'étude *in vitro* **Résultats et interprétation**

1. Données brutes

Les données brutes consistent en l'observation comparative du signal de PrP anormale des différents points de gamme avec ceux de PrP anormale résiduelle issus des supports et des effluents traités avec le produit ou procédé à tester, les traitements comparateurs et le ou les témoins d'efficacité partielle.

Pour chaque point, l'observation est qualitative : présence ou absence de signal.

Eventuellement, une comparaison quantitative de l'intensité des signaux permet d'estimer la quantité de PrP résiduelle au regard des signaux des différents points de gamme. S'il y a un doute sur un point, une quantification du signal par caméra est possible. L'interprétation nécessite l'établissement d'une limite de détection.

2. Expression des résultats

En l'absence d'analyse quantitative, les résultats sont exprimés de la manière suivante :

- Signal négatif : absence de PrP détectable, en tenant compte du seuil de détection de la méthode utilisée, qui sera indiqué en termes de dilution du témoin positif.
- Signal positif : tout signal positif détecté au-dessus du seuil de détection de la méthode.

En cas d'estimation quantitative du signal, il est possible d'estimer un facteur de réduction.

3. Interprétation des résultats

L'approche *in vitro* permet de préciser si l'efficacité du produit ou procédé repose sur des mécanismes d'élimination ou d'inactivation.

NB : Les résultats obtenus en présence de protéinase K (pK) doivent être interprétés avec réserve, notamment du fait de la sensibilisation possible de la PrP^{Sc} à un traitement préalable de type alcalin introduisant donc un biais d'interprétation.

En cas de résultats discordants entre les études *in vivo* et *in vitro*, ou en cas de résultats difficiles à interpréter, pour être exploitables, les résultats *in vitro* issus de techniques analytiques utilisant la pK feront état d'une manipulation sans traitement par la pK.

3.1 *Aucun signal (support et effluent)*

L'efficacité est vraisemblablement liée à une inactivation de la protéine prion, qu'un effet détergent y soit associé ou non.

3.2 *Signal dans l'effluent avec ou sans signal pour le support*

L'efficacité partielle est tout ou partie liée à une élimination de la protéine prion par effet détergent majeur sans inactivation totale.

3.3 Grille d'interprétation des résultats in vitro

Résultats analyse du support après traitement	Résultats analyse de l'effluent (ou solution)	Interprétation des résultats Support et effluent (ou solution) pour le produit ou procédé à tester
Signal négatif	Signal négatif	Inactivant
	Signal positif	Eliminant
Signal positif	Signal négatif	Non inactivant
	Signal positif	

Tableau 1: Interprétation résultats in vitro

Détermination de la performance du produit ou du procédé testé

Les performances du produit ou procédé résultent du croisement des résultats des phases d'étude *in vitro* et *in vivo*.

Produit ou procédé inefficace sur les ATNC :
soit sur la base des résultats *in vitro* (éliminant ou non inactivant),
soit sur la base des résultats *in vivo* (pas d'efficacité totale)

Produit ou procédé inactivant total :
efficacité totale *in vivo* sur les 2 souches
et
inactivant *in vitro* sur toutes les souches testées