

PROTOCOLE STANDARD PRION Novembre 2011

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

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION.....	3
2 - METHODE IN VIVO : MODELE HAMSTER INFECTE PAR LA SOUCHE 263K.....	3
2.1 Principe général.....	3
2.2 Mode opératoire.....	4
2.2.1 Préparation des homogénats et des supports	4
2.2.2 Inoculation des animaux	7
2.2.3 Durée de l'étude	7
2.3 Résultats.....	7
2.3.1 Données brutes	7
2.3.2 Expression des résultats et méthodologie statistique	8
2.3.3 Résultats	9
2.4 Interprétation des résultats de l'étude <i>in vivo</i> réalisée chez le hamster infecté par la souche 263K9	
3 - METHODE <i>IN VITRO</i>	10
3.1 Principe général.....	10
3.2 Résultats <i>in vitro</i>.....	11
3.2.1 Données brutes	11
3.2.2 Expression des résultats	11
3.2.3 Résultats	12
3.3 Interprétation des résultats de l'étude <i>in vitro</i>.....	12
4 - DETERMINATION DE LA PERFORMANCE DU PRODUIT OU DU PROCEDE TESTE	13

1 - Introduction

Le Protocole Standard Prion est un protocole opératoire devant permettre aux fabricants d'évaluer les performances de produits ou procédés revendiquant une élimination ou une inactivation des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) présents sur les dispositifs médicaux réutilisables après la dispensation des soins.

L'évaluation des performances du produit, ou procédé, repose sur une méthode *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 d'un facteur de réduction de l'infectiosité. Le modèle du hamster infecté par la souche 263K est requis en tant que modèle de référence utilisé dans de nombreuses études antérieures. En complément, des études *in vitro* d'analyse de la protéine prion doivent être réalisées 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 la méthode *in vivo*, comme pour la méthode *in vitro*, le protocole repose sur la contamination d'un support-modèle par un homogénat de cerveau infecté par la souche 263K. Des essais sont réalisés à l'aide d'un support modèle, un fils 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 inactivants totaux cités dans la circulaire 138 révisée 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.

Bien que mentionnée l'instruction DGS/RI3/2011/449 du 1^{er} décembre 2011, comme responsable d'inactivation importante et non pas d'inactivation totale 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.

En complément, au moins un des traitements réputés partiellement efficaces est appliqué en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces témoins internes d'efficacité partielle sont basés sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs.

Le mode opératoire de chacune des méthodes ainsi que l'interprétation des résultats sont détaillés ci-dessous. L'ordre de présentation des tests *in vitro* et *in vivo*, adoptée ci-dessous, ne préjuge en rien de la chronologie de réalisation de ces tests par les fabricants. En conclusion, un algorithme est proposé pour la détermination de la performance du produit ou du procédé testé selon les critères méthodologiques du PSP.

2 - Méthode *in vivo* : modèle hamster infecté par la souche 263K

La méthode *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.

2.1 Principe général

- Réalisation d'une gamme contrôle à partir d'homogénat de cerveau de hamster syrien, infecté par la souche 263K (cf. 2.2.1.1) afin de contaminer les supports, les fils d'acier inoxydable, (cf. 2.2.1.2) qui seront inoculés par voie intra-cérébrale à l'animal (cf. 2.2.2). Sur la base des données brutes recueillies (cf. 2.3.1), un taux de transmission et une période moyenne d'incubation sont calculés pour chaque dilution de la gamme de contrôle ; la dose infectieuse 50% (DI_{50}) adsorbée sur la surface des supports est calculée sur la base de ces taux de transmission (cf. 2.3.2).

- En parallèle, des supports contaminés à partir de l'homogénat de la première dilution de la gamme sont traités au moyen d'au moins deux des traitements comparateurs réputés comme inactivant (cf. 2.2.1.3), des

témoins d'efficacité partielle (cf. 2.2.1.4) et par le produit ou procédé à tester appliqué selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical (cf. 2.2.1.5). Les deux traitements comparateurs retenus devront être cohérents avec le produit ou le procédé à tester (e.g. un produit alcalin devra au moins se comparer à la soude tandis qu'un procédé à base de vapeurs d'agents actif devra au moins se comparer à la stérilisation par vapeur d'eau). Les supports ainsi traités sont alors inoculés à l'animal. Sur la base des données brutes recueillies (cf. 2.3.1), les mêmes paramètres que ceux de la gamme contrôle sont calculés (cf. 2.3.2).

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 (cf. 2.3.2 et 2.4).

2.2 Mode opératoire

2.2.1 Préparation des homogénats et des supports

2.2.1.1 Gamme contrôle

- 1) L'homogénat négatif est constitué d'un homogénat à 10% (poids/volume) de cerveau sain de hamster syrien préparé dans du PBS (1x, sans calcium ni magnésium, pH 7.2 stérile, par exemple réf. 75511 BioMérieux) à calibrer au travers d'une aiguille émoussée (Aiguille 25 G 0.5 mm de diamètre, par exemple réf. 3551120, BIO-RAD)
- 2) L'homogénat positif est constitué d'un homogénat à 10% de cerveau de hamster syrien infecté par la souche 263K au stade terminal de la maladie préparé dans du PBS et constitue le point 10^{-1} de la gamme. Cet homogénat est aliquoté (1ml) dans des tubes en polypropylène stériles et congelé à -80°C .
- 3) Les points suivants (10^{-2} à 10^{-9}) 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 de 0,5 ml sont préparés. A chaque dilution l'échantillon est soigneusement homogénéisé par agitation. La préparation se fait à température ambiante.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Homogénat positif	1ml	100µl							
Homogénat négatif		900µ	900µl	900µl	900µl	900µ	900µl	900µl	900µl

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.

2.2.1.2 Préparation et contamination des supports

✓ Description du support

Acier inoxydable 316, diamètre 0,16 mm à 0,3 mm, longueur 5 mm pour le modèle hamster.

✓ Préparation des fils d'acier inoxydable

Couper des fils d'une longueur de 5 mm

Éliminer les résidus de fabrication : traitement aux ultra-sons à puissance maximale pendant 15 minutes dans un bain d'éthyl acétate pur puis nettoyage au 2-propanol.

Rincer dans de l'eau ultra-pure pour ôter les traces de 2-propanol.

Éliminer les souillures biologiques : sonication à puissance maximale pendant 15 minutes dans une solution de triton X-100 à 2%.

Rincer à l'eau ultra-pure.

Sécher pendant 24 heures à température ambiante sous hotte à flux laminaire.

✓ Contamination des supports pour la gamme contrôle

Pour réaliser une gamme contrôle indispensable à l'estimation de la réduction de la charge infectieuse induite par les traitements, il convient de contaminer les supports préparés selon le mode opératoire suivant :

Disposer 200µl d'une dilution de la gamme contrôle préparée comme ci-dessus dans des tubes de type Eppendorf 2ml contenant 5 supports.

Placer le tube sous agitation lente 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) minimum 16 heures, à plat dans une boîte de Pétri stérile. Les supports doivent être bien individualisés les uns des autres.

Rincer 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 inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches.

Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation.

✓ Contamination des supports pour traitement comparateur, témoin d'efficacité partielle ou du produit ou procédé à tester

Pour estimer la réduction de la charge infectieuse par les traitements comparateurs, ou les traitements témoins d'efficacité partielle ou les produits ou procédés à tester, il convient d'appliquer les traitements sur des supports contaminés comme ci-dessus avec de l'homogénéat positif à la dilution 10^{-1} . Ces supports traités (cf. 2.2.1.3 à 2.2.1.5) seront ensuite inoculés à l'animal selon le mode opératoire décrit en 2.2.2.

Si les supports traités ne sont pas inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches.

Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation.

2.2.1.3 Traitements comparateurs

Les traitements comparateurs, réputés comme inactivant 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 du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements comparateurs cités ci-dessus. Les deux traitements comparateurs retenus devront être cohérents avec le produit ou procédé à tester (e.g. un produit alcalin devra au moins se comparer à la soude tandis qu'un procédé à base de vapeurs d'agent actif devra au moins se comparer à la stérilisation par vapeur d'eau.).

Les traitements comparateurs sont appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle (cf. 2.2.1.2).

Les traitements comparateurs liquides sont réalisés dans de l'eau dure préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476, ci-après appelée eau dure normée.

✓ Préparation de l'eau dure normée :

Solution A :

Dissoudre 19.84 g de chlorure de magnésium (MgCl₂) et 46.24 g de chlorure de calcium (CaCl₂) dans 1000 ml d'eau milliQ.

Stériliser par filtration sur membrane 0.22µm ou à l'autoclave.

Conservation 1 mois à +4°C.

Solution B :

Dissoudre 35,02 g de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) dans 1000 ml d'eau milliQ. Stériliser par filtration sur membrane 0.22µm.

Conservation 1 semaine à +4°C.

Diluer 6.0 ml de solution A + 8.0 ml de solution B dans 1000 ml d'eau milliQ stérile. Le pH doit être de 7.0 ± 0.2 à 20°C.

Utiliser dans les 12 h suivant la préparation.

✓ *Application du traitement comparateur à la soude 1 N 1 heure (18°C-25°C)*

Préparer la soude 1N extemporanément (2 grammes de pastilles de soude + eau dure normée (qsp 50 ml) à température ambiante).

Vérifier le pH.

Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml.

Ajouter 1ml de soude 1N fraîchement préparée 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 à l'eau de javel 20.000 ppm 1 heure (18°C-25°C)*

Préparer l'eau de javel 20 000 ppm ou 2% de chlore actif (c.a.) extemporanément, par dilution d'eau de javel liquide concentrée dans de l'eau dure normée.

Titrer le chlore actif¹ pour vérifier que le titre obtenu après dilution correspond bien au titre attendu.

Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml

Ajouter 1ml d'eau de javel 2 % c.a. fraîchement préparée dans les tubes contenant les supports contaminés 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 en verre (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 des traitements comparateurs, les étapes suivantes sont réalisées :

Les tubes sont laissés ouverts pendant au moins deux 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.

2.2.1.4 Témoins d'efficacité partielle

Des traitements réputés partiellement efficaces seront appliqués en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces traitements correspondent à des situations dégradées (en termes de concentration ou temps) des traitements comparateurs de référence. L'implantation des surfaces traitées avec de tels traitements doit induire une transmission partielle de la maladie (taux de transmission compris entre 1% et 99%) au cours de l'étude. Les conditions exactes (concentration, temps, température, pH, degrés chlorométrique) devront être renseignées.

A titre d'exemple, ces traitements peuvent être :

L'immersion dans la soude 0,1N pendant 15 minutes ou 1 heure à température ambiante.

L'immersion dans l'eau de javel 2 000 ppm ou 5 000 ppm pendant 15 minutes.

Tout comme pour les traitements comparateurs, ces traitements témoins d'efficacité partielle seront :

-appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle (cf. 2.2.1.2) selon le même mode opératoire que celui décrit pour les traitements comparateurs (cf. 2.2.1.3).

réalisés dans de l'eau dure normée préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476.

2.2.1.5 Produit ou procédé à tester

¹ Teneur en chlore actif des Eaux et Concentrés de Javel – Chambre syndicale Nationale de l'Eau de Javel – 05/06. www.eaudejavel.fr

Le produit ou le procédé à tester est appliqué, selon les recommandations du fabricant préconisées dans la notice d'instruction du dispositif médical, sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle (cf. 2.2.1.2).

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.

Les tubes sont laissés ouverts pendant 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 de l'évaluation **d'un procédé physique**, seules les trois dernières étapes (séchage / congélation / décongélation) sont appliquées.

2.2.2 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.

Des hamsters syriens femelles de 6 à 8 semaines sont préférés. Les animaux sont identifiés de manière individuelle (puce électronique, tatouage, ou bague) et hébergés selon les normes en vigueur.

Sous anesthésie générale, les hamsters sont inoculés par voie intra-cérébrale à raison d'un support par animal, laissé à demeure pendant toute la durée de l'étude (cf. 2.3.1).

- ✓ Pour les supports contaminés avec les différentes dilutions (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 sera inoculé par traitement, à raison de 4 animaux pour chacun des triplicats de traitement.

2.2.3 Durée de l'étude

La durée de l'étude doit être comprise entre 3 et 6 fois la période d'incubation minimale observée dans le modèle expérimental considéré.

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.

2.3 Résultats

2.3.1 Données brutes

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

- Numéro de l'expérience.
- Lignée de hamster utilisée.
- Son fournisseur et son statut sanitaire.
- Sexe.
- Date de naissance.
- Souche de prion inoculée.
- Date d'inoculation

- Date du début des signes cliniques par une surveillance 2 fois par semaine avec une description des signes cliniques².
- Date du sacrifice de l'animal.
- Le cerveau de chaque hamster est prélevé pour une recherche de la forme pathologique de la PrP par une méthode sensible et reconnue. Tous les hamsters survivants au terme de l'expérimentation sont euthanasiés et analysés.

2.3.2 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. La durée de l'étude doit donc être comprise entre 3 et 6 fois la période d'incubation minimale observée dans le modèle expérimental considéré. Ainsi, pour les hamsters la période d'incubation minimale étant de 90 jours, la durée de l'étude est de 12 à 18 mois.

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

- 1) Les hamsters dont le cerveau présente les caractéristiques biochimiques de la pathologie (PrPres +) sont considérés comme « infectés »
- 2) Les hamsters 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 hamsters ayant potentiellement pu présenter les signes de l'infection postérieurement à cette date.
- 3) Les autres hamsters, 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.

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) reposera sur l'analyse du statut final des hamsters. La détermination de la DI₅₀ reposera 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 du ou des témoins d'efficacité partielle appliqués.

Par ailleurs, un calcul précis de ce facteur de réduction ne pourra 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.

² 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.

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

2.3.3 Résultats

Les résultats devront comprendre au minimum :

- 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 doit être suffisante pour permettre d'observer une mortalité à la dilution 10^{-6} . Notamment, 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.

- Traitements comparateurs : dans les groupes d'animaux inoculés avec les supports traités avec les traitements comparateurs, aucune infection ne devra être observée (validation de la pertinence du modèle et de la bonne réalisation des procédés).

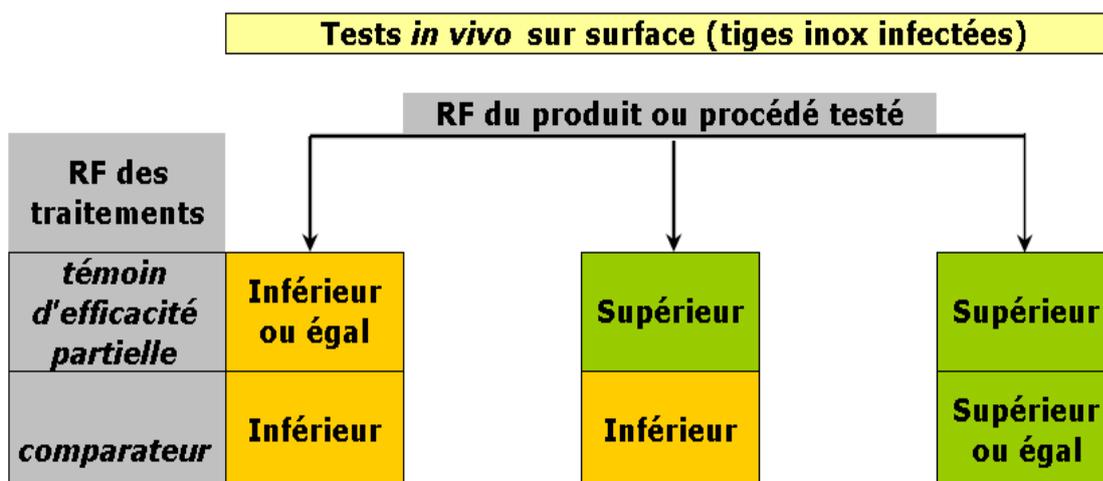
- Traitements témoins d'efficacité partielle : dans les groupes d'animaux inoculés avec les supports traités avec les traitements témoins d'efficacité partielle, un taux de transmission compris entre 1 et 99 % devra être observé (validation de la robustesse de la contamination).

- Traitement étudié : pour chaque produit ou procédé étudié, le taux de transmission devra être fourni, ainsi que les périodes d'incubation individuelles (une courbe de Kaplan-Meyer 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 permettront d'estimer un facteur de réduction induit par le produit ou le procédé à tester utilisé.

2.4 Interprétation des résultats de l'étude *in vivo* réalisée chez le hamster infecté par la souche 263K

Les tests *in vivo* ont pour objectif de quantifier la réduction de l'infectiosité (RF) du produit ou du 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 des traitements réputés d'efficacité partielle, c'est-à-dire soit des éliminants partiels soit des inactivants partiels.

Les cas de figure suivants peuvent être obtenus :



Sur la base des ces résultats l'efficacité du produit ou du procédé testé se décline :

- soit en absence d'efficacité du fait d'une diminution d'infectiosité due au produit ou procédé à tester qui est inférieure à celle obtenue avec le traitement témoin d'efficacité partielle ;
- soit en efficacité partielle quand la diminution d'infectiosité du produit ou du procédé testé est comprise entre celle obtenue avec le traitement témoin d'efficacité partielle et celle obtenue avec le traitement comparateur ;
- soit en efficacité totale quand la diminution d'infectiosité du produit ou procédé testé est au moins égale à celle obtenue avec le traitement comparateur.

Résultats Tests in vivo			
RF produit ou procédé testé	≤ RF traitement témoin d'efficacité partielle	> RF traitement témoin d'efficacité partielle < RF traitement comparateur	≥ RF traitement comparateur
Efficacité du produit ou du procédé testé	Inefficace	Efficacité partielle	Efficacité totale

3 - Méthode *in vitro*

Cette méthode *in vitro* vient en complément de la méthode *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) conduisant à la diminution d'infectiosité apparente.

3.1 Principe général

Pour l'approche *in vitro*, le protocole n'a pas vocation à figer une méthodologie particulière. Il présente les grandes lignes méthodologiques à respecter et laisse à l'appréciation du fabricant de présenter une technique avec les critères de qualité permettant une interprétation correcte des résultats.

Dans la mesure du possible, la méthodologie sera proche de celle utilisée pour la méthode *in vivo* décrite précédemment afin d'assurer une bonne corrélation entre les deux méthodes.

Le principe retenu est *a minima* celui d'une analyse biochimique visant à détecter la PrP, seul marqueur spécifique des maladies à prions, résiduelle sur les supports en comparaison d'une analyse en solution 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, soit dans les effluents générés par le traitement des supports. Les souches à tester sont la souche 263K et au moins une autre souche d'origine bovine ou humaine.

Cette analyse permet de qualifier la performance du produit ou du procédé en inactivant, éliminant (détergent) ou inactivant/éliminant.

Dans le cadre de cette approche *in vitro*, tous les détails nécessaires relatifs à la méthodologie utilisée devront être fournis afin de permettre de juger de la pertinence de l'approche choisie et de la cohérence des résultats. Notamment, les contrôles de spécificité et de sensibilité devront être renseignés.

Le rapport d'étude comprend, notamment :

- Une description et une justification du (des) modèle (s) expérimental (aux) (souche prion) retenu(s) en complément de la souche 263K ;

- Idéalement, le support utilisé pour l'étude *in vitro* est identique à celui utilisé pour l'étude *in vivo*, le fil d'acier inoxydable. Le fabricant devra justifier l'utilisation d'un autre support et en donner une description détaillée.
- Une description détaillée du mode de contamination des supports par les souches prion, si le mode de contamination retenu n'est pas celui décrit pour la méthode *in vivo* ;
- Une description détaillée de la réalisation de la gamme contrôle, si celle-ci diffère de la réalisation de la gamme de la méthode *in vivo*.
- Pour la méthode *in vitro* cette gamme contrôle permet d'attester de la robustesse et de la sensibilité de la technique utilisée ;
- La justification du choix des traitements comparateurs et du ou des traitements témoins d'efficacité partielle ;
- 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 comparateur. Les deux traitements comparateurs retenus devront être cohérents avec le produit ou procédé à tester. En complément, des traitements réputés partiellement efficaces sont appliqués en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces traitements d'efficacité partielle seront basés sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs, et ils devront être adaptés au modèle afin d'avoir une efficacité partielle par rapport à la gamme contrôle de l'essai.
- La description du mode d'application de ces traitements et du produit ou procédé à tester sur les supports contaminés ;
- Si le produit ou procédé à tester génère des effluents qui seront analysés, la description détaillée du recueil des effluents ;
Par effluents on entend
 - les liquides récupérés après l'application d'un traitement liquide sur le support contaminé,
 - éventuellement, les 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.

Le fabricant peut au choix, décider d'une étude de l'efficacité du procédé sur un homogénat cérébral en solution, notamment en cas de difficulté technique à gérer l'inactivation des effluents et/ou le volume de récupération de l'effluent à tester.

- La description détaillée de l'analyse biochimique des supports, des effluents ou des solutions.
- Généralement, les techniques utilisent une désorption de la PrP du support pour une analyse immunologique 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.

Chaque manipulation est réalisée avec et sans traitement à la protéinase K (PK). Pour être exploitables, les résultats doivent obligatoirement faire état d'une manipulation sans traitement par la PK.

3.2 Résultats *in vitro*

3.2.1 *Données brutes*

Les données brutes consistent en l'observation comparative du signal de PrP des différents points de gamme avec celui de PrP 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.

- Signaux en chimiluminescence non linéaires sur la totalité de la gamme
- Pour chaque puits, 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 puits, une quantification du signal par caméra est possible. L'interprétation nécessite l'établissement d'une limite de détection.

3.2.2 *Expression des résultats*

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

- Signal négatif dans le puits considéré : absence de PrP détectable, en tenant compte de la limite de dilution du témoin positif détectable.

- Signal positif dans le puits considéré : si celui-ci est faible et inférieur au dernier point de gamme, on peut annoncer une diminution significative. Si celui-ci est d'intensité supérieure, on ne peut pas conclure à une diminution significative du signal.

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

3.2.3 Résultats

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

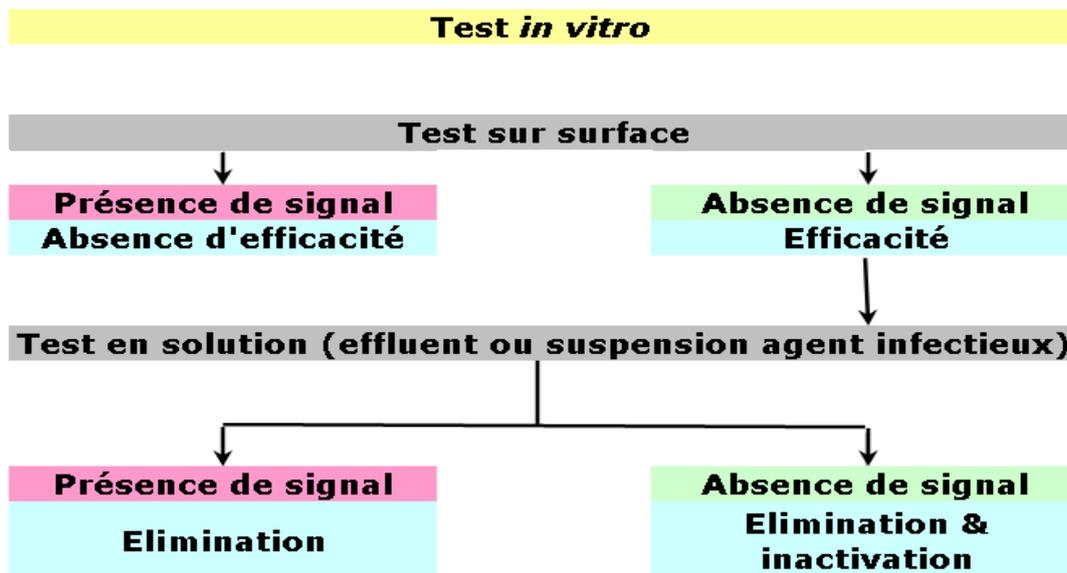
Deux scénarios sont notamment envisageables :

- Aucun signal (support / effluent ou solution)
L'efficacité partielle est probablement liée à une inactivation de la protéine prion, qu'y soit associé un effet détergent ou non.
- Signal dans l'effluent (ou solution) avec / sans signal pour le support
L'efficacité partielle est tout ou partie liée à une élimination de la protéine prion par effet détergent majeur.

Les résultats obtenus en présence de protéinase K doivent être interprétés avec réserve, notamment du fait de la sensibilisation possible de la PrPsc à un traitement préalable de type alcalin introduisant donc un biais d'interprétation.

3.3 Interprétation des résultats de l'étude *in vitro*

L'étude *in vitro* a pour objectif de préciser le mécanisme d'action d'un produit ou d'un procédé vis-à-vis du prion en discriminant l'inactivation des ATNC de leur simple élimination de la surface du dispositif médical. Le principe retenu est celui de l'analyse biochimique visant à détecter la PrP (protéine prion) résiduelle sur la surface des dispositifs médicaux en comparaison à une analyse de la PrP en solution. Le logigramme ci-dessous présente les cas de figure possibles. « présence de signal » signifie que l'analyse biochimique a permis la détection de la PrP, alors que pour « absence de signal », la PrP n'est plus détectée.



Sur la base des ces résultats le mécanisme d'action du produit ou du procédé testé se décline en :

- soit inefficace du fait de la présence de PrP résiduelle sur la surface qui mime le dispositif médical ;
- soit éliminant si la PrP résiduelle n'est plus détectable sur la surface mais uniquement en solution ;
- soit inactivant (avec +/- phénomène d'élimination possible) si la PrP résiduelle n'est plus détectable en surface et en solution.

Résultats Tests in vitro							
Test sur surface	Présence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Test en suspension	-	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence	Absence
Mécanisme d'action du produit ou du procédé testé	Inefficace	Eliminant			Inactivant		

4 - Détermination de la performance du produit ou du procédé testé

Les performances du produit ou procédé résultent du croisement des résultats des méthodes *in vitro* et *in vivo* et se déclinent-en :

- inefficace sur les ATNC, soit sur la base des résultats *in vitro* uniquement (absence d'efficacité pour les tests *in vitro* sur surface), soit sur la base des résultats *in vivo* uniquement (dès lors que la diminution d'infectiosité due au produit ou procédé à tester est inférieure à celle obtenue avec le traitement témoin d'efficacité partielle)
- éliminant partiel ou total
- inactivant partiel ou total.

Résultats Tests in vitro							
Test sur surface	Présence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Test en suspension	-	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence	Absence
Mécanisme d'action du produit ou du procédé testé	Inefficace	Eliminant			Inactivant		
Résultats Tests in vivo							
RF produit et procédé testé	-	≤ RF traitement témoin d'efficacité partielle	> RF traitement témoin d'efficacité partielle < RF traitement comparateur	≥ RF traitement comparateur	≤ RF traitement témoin d'efficacité partielle	> RF traitement témoin d'efficacité partielle < RF traitement comparateur	≥ RF traitement comparateur
Efficacité	-	Inefficacité	Efficacité partielle	Efficacité totale	Inefficacité	Efficacité partielle	Efficacité totale
Performances							
Résultante	Inefficace	Inefficace	Eliminant partiel	Eliminant total	Inefficace	Inactivant partiel	Inactivant total

Cet algorithme n'a pas vocation à positionner les performances de tous les produits et procédés. Il ne peut pas être utilisé pour des produits ou des procédés présentant des propriétés séquestrantes ou agrégantes de protéines ou des produits réputés fixant les protéines sur les surfaces. L'interprétation des résultats des méthodes *in vitro* et *in vivo* ne serait pas adaptée et aboutirait à des performances erronées.

Pour de tels produits ou procédés le fabricant devra fournir un argumentaire pour justifier :

- de la validité des résultats malgré les propriétés de son produit ou procédé
- de la performance retenue par rapport à cet algorithme.