

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 25 mai 2018

NOTE d'appui scientifique et technique

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'évaluation de l'efficacité des produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection lors de dangers sanitaires : dangers prions

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 03 août 2015 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation d'un appui scientifique et technique relatif (AST) à l'évaluation de l'efficacité des produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection¹ des sites d'élevage reconnus infectés d'un des dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie listés dans l'arrêté du 29 juillet 2013 (modifié le 1^{er} novembre 2017²).

¹ Selon la norme EN 14885, la désinfection chimique est la réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inanimée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné.

² <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027831750>

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'arrêté du 29 juillet 2013 fixe les listes des dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie auxquels sont exposés les animaux en s'appuyant sur les avis de l'Anses « Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine » du 12 juin 2012 et « Méthodologie de hiérarchisation des maladies animales ; application aux agents pathogènes exotiques pour la France métropolitaine » du 26 janvier 2012.

Les dangers sanitaires de 1^{ère} catégorie regroupent des dangers qui, du fait de leur importance, requièrent, dans un but d'intérêt général, des mesures de prévention, de surveillance ou de lutte rendues obligatoires par l'autorité administrative. Les dangers sanitaires de 2^{ème} catégorie regroupent les dangers sanitaires d'intérêt collectif règlementés ou devant faire l'objet d'un signalement à l'Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE) ou à la Commission européenne, et les maladies faisant l'objet d'un programme collectif volontaire reconnu.

L'arrêté du 28 février 1957 (Annexe 1), relatif à la désinfection dans le cas de maladies contagieuses des animaux précise que les désinfectants « *utilisés dans le cas des maladies contagieuses du bétail soumises à déclaration obligatoire ou contre celles qui font l'objet d'une prophylaxie collective organisée par l'Etat* » sont soumis à un agrément délivré par le Ministère en charge de l'agriculture. Pour bénéficier de cet agrément, les fabricants s'appuyaient sur des normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) dans un premier temps puis progressivement du Comité Européen de Normalisation (CEN) au fur et à mesure de leurs publications afin de tester l'efficacité de leurs produits et le Ministère en charge de l'agriculture (DGAL) délivrait l'agrément après un avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) sur chaque dossier. Ces normes ont aujourd'hui évolué, certaines ont été supprimées, d'autres remplacées et de nouvelles ont été créées. D'autre part, dans le cadre du Règlement (UE) n°528/2012³ (dit règlement biocides) concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, les produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection des sites d'élevage reconnus infectés d'un des dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie listés dans l'arrêté du 29 juillet 2013, appartiennent :

- Au type de produit 3 (TP3) relatif à l'hygiène vétérinaire (produits utilisés pour l'hygiène vétérinaire et pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux) ;
- Au type de produit 4 (TP4) relatif aux surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (produits utilisés pour désinfecter les matériels, les conteneurs, les ustensiles de consommation, les surfaces ou conduits utilisés pour la production, le transport, le stockage ou la consommation de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux (y compris l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux) ;
- Au type de produit 5 (TP5) relatif à l'eau potable (produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinées aux hommes et aux animaux).

Les demandes d'autorisation de mise sur le marché de ces produits biocides en application du Règlement (UE) n°528/2012 sont adressées à l'Anses, qui évalue la conformité du produit aux conditions requises à l'article 19 du règlement sus-cité.

³ Règlement (UE) n°528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

Dans ce contexte, il est demandé à l'Anses de répondre aux questions suivantes :

- *Question 1 : Considérant que ces normes européennes sont aujourd'hui reconnues au niveau international, indiquer si l'ensemble des dangers sanitaires de 1^{ère} et 2^{ème} catégorie sont couverts dès lors que sont éliminés les micro-organismes mentionnés dans les normes. Sinon pourriez-vous indiquer, pour chaque norme, les micro-organismes d'essai additionnels qui permettraient de couvrir l'ensemble de ces dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie, et/ou des conditions opératoires supplémentaires qui permettraient d'éliminer ces microorganismes lors des opérations de désinfection dans un foyer. La question des prions pourra être traitée séparément.*

Note : Les termes « additionnels » et « supplémentaires » ont été compris par les experts comme complémentaires c'est-à-dire devant s'ajouter aux exigences présentes dans les normes.

- *Question 2 : Concernant les désinfectants déjà autorisés, pourriez-vous déterminer la validité des agréments délivrés au regard des nouvelles normes ?*

Par ailleurs cette saisine comportait une troisième question liée plus spécifiquement à la désinfection des œufs à couver (OAC), qui a été gérée indépendamment des deux premières questions :

- *Question 3 : Pourriez-vous étudier les risques d'une utilisation de produits biocides de catégorie TP3 et/ou TP4 sur les œufs à couver et si ces derniers produits biocides ne sont pas autorisés pour le contact alimentaire, la nécessité d'une exclusion des œufs à couver de la consommation humaine ou animale.*

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

Pour la première et deuxième question, les dangers sanitaires relatifs aux virus et aux bactéries ont été traités dans la note 1 de l'AST 2015-SA-0178, en date du 2 décembre 2016. La troisième question a été expertisée dans la note 2 du même AST. Pour la suite des questions 1 et 2, les dangers sanitaires de type protozoaires, helminthes, microsporidies et oomycètes faisant l'objet de traitements au moyen de biocides désinfectants (TP 1, 3, 4, 5) ont été traités dans la note 3 de l'AST 2015-SA-0178 en date du 26 octobre 2017. Les travaux d'expertise relatifs à cette quatrième note ayant pour objet les dangers sanitaires de type prion ont été réalisés par 3 rapporteurs. Leur rapport a été présenté et validé, lors des réunions plénières du CES SABA des 6 février et 8 mars 2018.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES SABA

3.1. Généralités

3.1.1. Rappels sur les formes de maladies à prion chez les ruminants

Les prions sont des agents transmissibles de nature exclusivement protéique (acronyme de *PROteinaceous Infectious particle*) responsables de maladies neurodégénératives fatales d'évolution lente (sans phase de rémission), appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Elles affectent l'homme et plusieurs espèces animales. Les prions sont constitués d'une protéine de l'hôte, la PrP^{C4}, sous une conformation anormale. Au cours des EST, la PrP^C subit des changements de conformation majeurs et devient pathologique, elle est alors dénommée PrP^{Sc5}. Le processus de conversion de la PrP^C survient spontanément (formes idiopathiques et génétiques) ou est provoqué par contact avec les assemblages de molécules de PrP^{Sc} infectantes. Ce processus de conversion est auto-entretenu et conduit à l'accumulation d'agrégats de PrP^{Sc}, principalement dans le cerveau. Ces agrégats se révèlent à terme directement ou indirectement responsables des désordres neurologiques observés. Il existe, chez une même espèce hôte, diverses souches de prions aux propriétés biologiques distinctes. Ces dernières incluent le temps d'incubation de la maladie, la nature des signes cliniques, les aires cérébrales de la neurodégénérescence et la capacité des prions à se répliquer dans le tissu lymphoïde (Beringue, Vilotte, et Laude 2008). La diversité de souches de prion est vraisemblablement associée à des conformations différentes de la PrP^{Sc}.

La tremblante du mouton et de la chèvre, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et la maladie du dépérissement chronique (MDC) des cervidés constituent les principales EST animales. Derrière ces noms génériques se cache une multitude de souches de prions dont l'efficacité de propagation chez la même espèce hôte s'avère variable en fonction des polymorphismes dans le gène de la PrP (*Prnp*) de l'hôte, notamment chez les petits ruminants et les cervidés (Robinson *et al.* 2012, Angers *et al.* 2014). La répllication dans les tissus lymphoïdes dépend du polymorphisme du gène de la PrP et de la souche considérée.

3.1.1.1. Encéphalopathie spongiforme bovine

Chez les bovins, hormis la souche responsable de la forme classique d'ESB (ESB-C) qui est à l'origine de l'épizootie de la maladie, il existe deux autres souches responsables de formes dites atypiques d'ESB. Celles-ci sont dénommées ESB-H et ESB-L (ou BASE), en référence aux masses moléculaires respectives (*high* ou *low*), observées après migration électrophorétique, de la PrP^{Sc} non glycosylée présente dans le cerveau des animaux atteints. Ces formes atypiques ont été identifiées en France, chez des bovins âgés de 8 ans et plus (Sala *et al.* 2012). Hormis un cas d'ESB type H ayant été associé à une mutation génétique (Richt et Hall 2008), il n'existe pas d'autres facteurs génétiques de sensibilité décrits chez les bovins.

L'agent de l'ESB a par ailleurs été décrit chez les petits ruminants, mais à ce jour seulement 2 cas ont été rapportés en Europe : un caprin en France (Eloit *et al.* 2005) et un caprin au Royaume-Uni (Spiropoulos *et al.* 2011).

⁴ PrP^C : forme normale (ou cellulaire) de la protéine du prion

⁵ PrP^{Sc} : forme pathologique de la protéine du prion

3.1.1.2. Tremblante du mouton

Il existe des formes dites classiques (présentes en Europe depuis plusieurs siècles) et une forme atypique de tremblante. Cette dernière a été initialement identifiée en Norvège en 1998 [également appelée « souche Nor98 » (Benestad *et al.* 2003)], puis dans le reste de l'Europe avec la mise en place de la surveillance active des EST chez les petits ruminants. L'évolution de leur prévalence dans chaque Etat Membre est assez contrastée (EFSA 2014a). Ces dernières années, la situation de la tremblante classique s'est améliorée en France ; avec une décroissance significative, la prévalence de la tremblante classique est désormais inférieure à celle de la tremblante atypique. A l'échelon européen, en revanche, on observe une stagnation générale de la situation (Anses 2015) et la prévalence générale de la tremblante classique reste supérieure à celle de la tremblante atypique (EFSA 2017a). Il est probable que la régression de la tremblante classique constatée en France soit la conséquence de l'intensification du dépistage entre 2005 et 2007. En particulier, les mesures de surveillance ont permis l'identification d'un nombre important de foyers de tremblante puis leur éradication, compte tenu des mesures de police sanitaire appliquées (abattage des animaux sensibles et très sensibles, repeuplement par des animaux résistants). Un programme national d'amélioration génétique des ovins pour la résistance à la tremblante, qui a eu un impact très significatif sur la proportion d'allèles de résistance dans les noyaux de sélection ovine, a également été mis en place depuis 2002. Néanmoins, il est difficile de connaître l'impact de ce programme sur les brebis de production, la diffusion des allèles de résistance dans la population générale étant par ailleurs un phénomène beaucoup plus lent (Anses 2010, 2012b, 2017).

La tremblante atypique serait d'origine spontanée, affectant généralement des animaux âgés de plus de 4 ans (Benestad *et al.* 2008). Si les moutons homozygotes pour l'allèle A136R154R171 de la PrP se révèlent plutôt résistants aux prions de tremblante classique, ils sont parfaitement sensibles aux prions de la tremblante atypique. En effet, pour cette dernière maladie ; le déterminisme génétique de la sensibilité chez les ovins est radicalement différent de celui observé en tremblante classique ou pour l'ESB classique. Un sur-risque majeur de développer la tremblante atypique est associé aux allèles AHQ et AF141RQ, alors que les animaux de génotype ALRQ/ALRQ et VRQ/VRQ semblent moins à risque (Anses 2012b).

3.1.1.3. Maladie du dépérissement chronique des cervidés

La MDC affecte certaines espèces de cervidés : Wapiti (*Cervus canadensis*), Cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), Cerf mulot (*Odocoileus hemionus*), Elan (*Alces alces*), Renne (*Rangifer tarandus*), Cerf élaphe (*Cervus elaphus*).

Décrite uniquement sur le continent nord-américain et en Corée du Sud avant 2016, quatorze cas ont depuis été identifiés en Norvège, parmi les rennes, les élans et chez un cerf élaphe⁶. Si les prions affectant les rennes semblent proches de ceux décrits en Amérique du Nord. Les prions affectant les élans semblent différer au plan biochimique, notamment par le profil de migration électrophorétique de la PrP^{Sc} après digestion expérimentale par les protéases. Ceci comporte en particulier l'étude des caractéristiques de masse moléculaire (*high* ou *low*), de répartition des glycoformes (répartition entre les pourcentages des bandes bi- et mono-glycosylée) et la présence ou non de formes tronquées de la protéine prion résistante à la protéinase K.

⁶ <https://www.vetinst.no/en/news/surveillance-and-eradication-effort-towards-cwd-copy>

En termes de risque zoonotique, seule l'ESB classique est considérée à ce jour comme une zoonose. Elle est responsable chez l'homme de la forme variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Toutefois la transmission en conditions expérimentales des agents de l'ESB-L, de la tremblante classique ou de la maladie du dépérissement chronique (MDC) à des modèles de souris exprimant la PrP humaine et/ou à des primates non-humains (*Macaca fascicularis*) suggère un potentiel zoonotique de ces agents.

3.2. Mesures de police sanitaires spécifiques aux dangers sanitaires prions et aux EST

Lors de la mise en évidence de cas d'EST par les différents réseaux de surveillance (abattoirs, équarrissage, suspicions cliniques) des mesures de police sanitaire spécifiques sont prévues dans les troupeaux dont sont issus les cas ou par lesquels ils ont transité.

3.2.1. Règlementation Européenne

3.2.1.1. Pour les bovins

Le Règlement (CE) n°999/2001⁷ ne prévoit aucune opération de nettoyage et désinfection des exploitations à risque suite à la mise en évidence d'un cas index d'ESB.

3.2.1.2. Pour les petits ruminants

En cas d'infection par les agents de la tremblante classique ou de l'ESB, le Règlement (CE) n°999/2001 ne prévoit des opérations de nettoyage et désinfection de tous les logements pour animaux de l'exploitation après abattage des animaux, que si l'exploitant veut, par la suite, réintroduire des caprins dans son exploitation. A la date de la rédaction de cette note d'AST, les allèles de résistance maintenant documentés pour les caprins ne sont pas actuellement pris en compte dans des textes réglementaires européens ou nationaux.

3.2.2. Règlementation nationale

Les arrêtés nationaux prévoient des mesures de police sanitaires pour les EST. Ils ont fait l'objet de plusieurs adaptations en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques, des transpositions du droit européen (notamment quand plusieurs options étaient au choix des Etats Membres) et des décisions des autorités de gestion du risque.

3.2.2.1. Pour les bovins

Les études épidémiologiques réalisées sur l'ESB classique ont montré que les animaux se contaminaient majoritairement pendant leur première année de vie par le biais de leur alimentation (cohortes de naissance des années 1990 à 2000) (Anses 2012a).

L'arrêté du 3 décembre 1990⁸ (version en vigueur, l'arrêté initial ayant fait l'objet de nombreuses modifications depuis sa parution, jusqu'en 2011) prévoit principalement le

⁷ Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=OJ:L:2001:147:TOC>

marquage et l'élimination des animaux à risque susceptibles d'avoir reçu la même alimentation contaminée que le cas index, pendant les premières années de leur vie. Il s'agit d'un marquage et d'une élimination de la « cohorte alimentaire » (par opposition à l'abattage et élimination totale pratiqués jusqu'en décembre 2002).

Ainsi :

- dans l'exploitation de naissance du cas index : les animaux qui sont nés 12 mois avant ou 12 mois après le cas index sont marqués et euthanasiés ;
- dans les autres exploitations dans laquelle le cas index a séjourné pendant les deux premières années de sa vie : les bovins qui ont été élevés, à un quelconque moment des douze premiers mois de leur existence, avec le bovin atteint alors que ce dernier était âgé de moins de vingt-quatre mois, sont marqués et euthanasiés.

Des mesures d'élimination sont également prévues pour la descendance du cas index.

L'arrêté du 3 décembre 1990 ne prévoit aucune mesure de nettoyage et désinfection particulière dans les élevages à risque identifiés suite à la détection d'un bovin infecté par l'ESB.

3.2.2.1 Pour les ovins et les caprins

Il existe deux arrêtés de police sanitaire pour les EST des petits ruminants^{9 ; 10}, les mesures se différencient selon :

- l'espèce (ovine ou caprine). Pour les ovins, la résistance génétique de certains animaux est prise en compte pour éviter leur euthanasie et pour le repeuplement de l'élevage. Pour les caprins, tous les animaux sont marqués et euthanasiés ;
- la souche identifiée dans les foyers infectieux : tremblante classique, tremblante atypique et ESB des petits ruminants ;
- le caractère sédentaire ou nomade du cas index (s'il a toujours séjourné dans le même troupeau ou a transité par plusieurs troupeaux).

Néanmoins dans tous les cas, aucune opération de nettoyage/désinfection n'est prévue dans les exploitations placées sous APMS¹¹.

Par contre il est prévu dans ces arrêtés, des opérations de nettoyage et de désinfection complète des exploitations placées sous APDI¹², suite à la confirmation de tremblante classique, de tremblante atypique ou d'ESB des petits ruminants¹³, sous couvert de la mention « dans les conditions fixées par instruction du ministre chargé de l'agriculture ». Celles-ci n'ont pas été définies réglementairement jusqu'à présent. En pratique, des opérations de nettoyage suivies d'une désinfection avec des produits à base d'hypochlorite de sodium ont pu être mises en œuvre par le passé dans un foyer (communication Fédération Nationale des

⁸ Arrêté du 3 décembre 1990 fixant les mesures de police sanitaire relatives à l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB chez les bovins).

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00000353179&fastPos=1&fastReqId=2099842466&categorieLien=cid&oldAction=rechTexte>

⁹ Arrêté du 2 juillet 2009 fixant les mesures de police sanitaires relatives aux EST ovines (version en vigueur) <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020835192&dateTexte=20171217>

¹⁰ Arrêté du 2 juillet 2009 fixant les mesures de police sanitaires relatives aux EST caprines (version en vigueur).

https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?jsessionid=59A093705B861760BF3EA787D701B0B6.tplqfr24s_3?cidTexte=JORFTEXT000020849517&dateTexte=20171112

¹¹ Arrêté Préfectoral de mise sous surveillance

¹² Arrêté préfectoral de déclaration d'infection

¹³ Voir articles 9, 10 et 12

Groupements de Défense Sanitaire), mais les modalités exactes et l'efficacité du protocole appliqué n'ont pas été évaluées dans l'exploitation traitée.

En résumé, seuls les foyers confirmés de tremblante classique, de tremblante atypique ou d'ESB des petits ruminants (exploitations sous APDI), sont concernés par des opérations obligatoires de nettoyage et désinfection.

Les modalités de mise en œuvre de ces opérations n'ont pas été réglementairement définies.

La législation française va au-delà de la réglementation communautaire pour laquelle des opérations de nettoyage et désinfection ne sont prévues qu'en préalable au repeuplement par des caprins d'un foyer de tremblante classique ou d'ESB des petits ruminants.

3.3. Réponses aux questions de la saisine

Pour rappel, la question 1 de la saisine a été divisée en deux parties :

- *« Les dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie sont-ils couverts dès lors que sont éliminés les micro-organismes mentionnés dans les normes ? »*
- *Indiquer, pour chaque norme, les micro-organismes d'essai additionnels qui permettraient de couvrir l'ensemble de ces dangers sanitaires de 1^{ère} et de 2^{ème} catégorie, et/ou des conditions opératoires supplémentaires qui permettraient d'éliminer ces microorganismes lors des opérations de désinfection dans un foyer. »*

3.3.1. Méthodologie de travail

Afin de répondre à ces questions, les experts ont suivi le raisonnement illustré dans la figure 1, en prenant en compte les critères suivants :

- la présence du danger sanitaire visé et / ou de l'espèce hôte sur le territoire français ;
- l'existence d'une contamination et d'une persistance du danger sanitaire dans l'environnement extérieur ;
- la pertinence du traitement du milieu au regard de sa faisabilité en fonction des types de milieux contaminés ;
- l'existence de normes ou de méthodologies reconnues.

Dans la suite de ce rapport, l'arbre décisionnel sera appliqué aux différents types de dangers sanitaires prions visés : ESB-C, ESB-H, ESB L, Tremblante classique, Tremblante atypique et MDC.

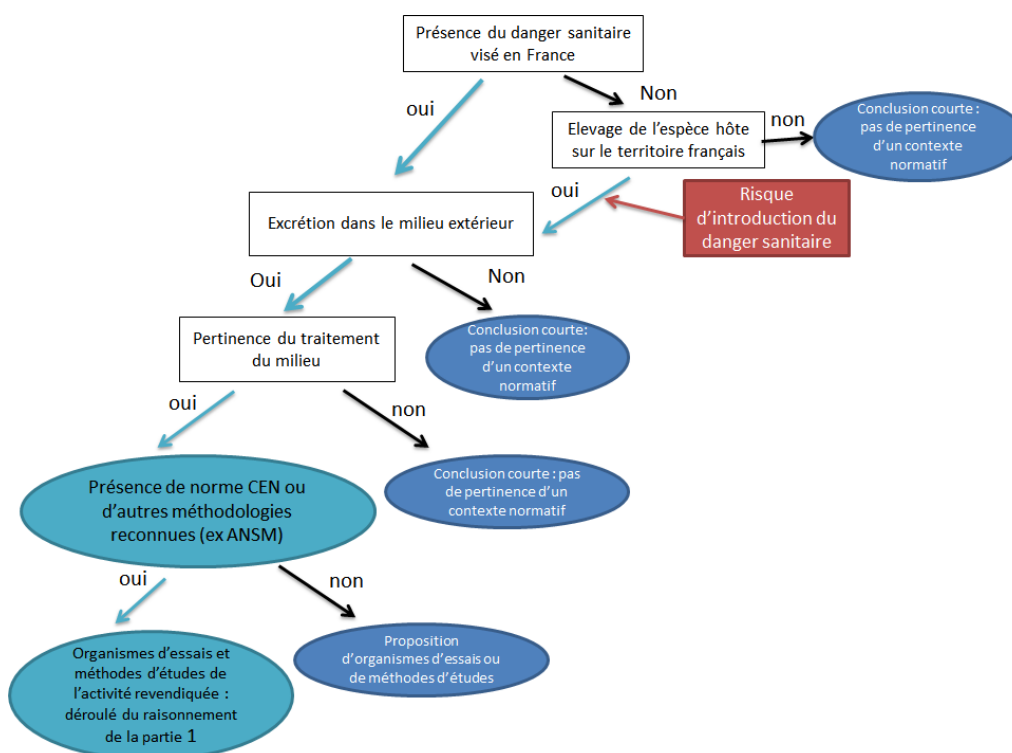


Figure 1 : Schéma décisionnel appliqué aux différents dangers sanitaires en vue des réponses aux questions posées (CEN : Comité européen de normalisation ; ANSM : Agence Nationale de sécurité du Médicament et des produits de santé)

3.3.2. Evaluation de la pertinence de réaliser un nettoyage et désinfection en exploitation

Les mécanismes exacts de diffusion des agents responsables des maladies à prion au sein de l'organisme restent incertains bien que clairement dépendants de l'espèce cible (ovine, caprine, bovine, cervidé) et de la souche d'EST (ESB-C, ESB-L, ESB-H, tremblante classique, tremblante atypique /Nor98, MDC). L'ensemble des caractéristiques des dangers sanitaires prions est présenté dans le Tableau 1, en Annexe 3.

3.3.2.1 Cas de l'encéphalopathie spongiforme bovine classique

L'ESB classique est devenue extrêmement rare en France : pendant 4 années consécutives (années 2012 à 2015), aucun cas n'a été détecté à l'équarrissage et à l'abattoir. Néanmoins un dernier cas d'ESB classique a été identifié début 2016 par le réseau de surveillance à l'équarrissage chez un animal né en 2011 (animal né après l'interdiction totale des farines animales dans les espèces de rente en 2000). Les causes d'infection de ces animaux, plusieurs années après l'interdiction totale des farines animales, restent hypothétiques. Si au plus fort de

l'épizootie, l'origine alimentaire a été mise en évidence par les études épidémiologiques pour les animaux nés dans les années 1980 et 90, on ne peut exclure qu'une modalité de contamination minoritaire (autre que par le biais d'aliments contaminés) ou une origine spontanée à très faible niveau de prévalence soit passée inaperçue. Toutefois dans sa dernière évaluation sur cette thématique, le Comité Biohaz de l'EFSA estime que, même pour les cas hyper NAIF¹⁴, une contamination par le biais de l'alimentation est encore possible. Compte tenu de la stabilité des prions pendant plusieurs années et des circuits de fabrication et de distribution des aliments pour espèces de rente, des petits agrégats d'anciens aliments contaminés liés aux surfaces pourraient encore être relargués aléatoirement (EFSA 2017c).

Chez un animal infecté, si les prions sont présents dans quelques structures en dehors du système nerveux central, la répartition et les niveaux d'infectiosité de ces structures semblent limités par rapport aux prions de tremblante classique lymphotropes.

Compte-tenu de :

- **la distribution limitée de l'agent de la forme classique de l'ESB (ESB-C) (en termes d'infectiosité) en dehors du système nerveux central et de l'intestin ;**
- **l'absence de données sur l'excrétion de l'agent de la forme classique de l'ESB ;**
- **l'absence de publications qui attestent de la contamination du matériel d'élevage ou des pâtures par l'agent de la forme classique de l'ESB, comme cela peut l'être dans le cas de la tremblante classique ;**
 - **et considérant cependant que les sources de contamination environnementales potentielles¹⁵ ne sont pas totalement exclues pour les animaux nés après 2000 (à l'instar d'autres hypothèses de contamination) malgré une incidence extrêmement faible depuis 2012 ;**

de l'avis des experts et en l'état actuel des connaissances, la mise en œuvre d'opérations de désinfection dans une exploitation de bovins infectée par l'agent de l'ESB classique n'apparaît pas justifiée en plus des mesures de police sanitaire en vigueur (voir paragraphe 3.2).

3.3.2.2 Cas des encéphalopathies spongiformes bovines atypiques

Quelques cas d'ESB atypiques sont identifiés chaque année en France (de 0 à 3 au cours des 3 dernières années) (Cazeau G. *et al.* 2015, Cazeau *et al.* 2017, EFSA 2017a). Les données de répartition de l'agent infectieux chez les animaux infectés soit par la souche H, soit par la souche L sont parcellaires et de nombreux travaux seraient nécessaires afin de déterminer si leur distribution diffère ou non de celle de l'ESB classique (EFSA 2014b). Le peu de données suggère néanmoins une réplique périphérique limitée. Ces résultats expérimentaux doivent être considérés avec précaution dans la mesure où une infection expérimentale peut différer d'une cause spontanée en termes de distribution de l'agent infectieux.

¹⁴ Hyper NAIF : cas né après l'interdiction totale des farines de viandes et d'os dans les aliments des animaux de rente (1^{er} Janvier 2001).

¹⁵ Dans son dernier avis (EFSA 2017), des facteurs de risque de contamination environnementale ont été examinés comme : présence d'un précédent foyer d'ESB au sein de l'exploitation, l'utilisation de matières fertilisante issues de sous-produits de ruminants, la gestion des cadavres bovins au sein de l'exploitation, sites à risque à proximité de l'exploitation.

A l'instar de l'ESB classique, il n'existe pas de données relatant l'excrétion dans le milieu extérieur, c'est-à-dire la possibilité de présence de l'agent sur le matériel d'élevage ou les pâtures des exploitations à risque. Contrairement à l'ESB classique, il ne semble pas y avoir de lien avec l'alimentation. Une des hypothèses souvent avancée par la communauté scientifique est que ces cas seraient d'origine spontanée du fait de l'âge relativement avancé des animaux et de la faible prévalence de la maladie, par analogie avec les cas humains de MCJ sporadiques.

Compte-tenu :

- de l'hypothèse d'une distribution limitée de l'agent de l'ESB atypique dans les tissus périphériques ;
 - de l'absence de données relatant l'excrétion de l'agent de l'ESB atypique dans le milieu extérieur et de lien avec l'alimentation ;
- en l'état actuel des connaissances, les experts ne sont pas en mesure de justifier l'intérêt du nettoyage et de la désinfection d'une exploitation bovine infectée par l'agent de l'ESB atypique en plus des mesures de police sanitaire en vigueur (voir paragraphe 3.2).**

3.3.2.3 Cas de la tremblante classique

La tremblante classique est encore présente en France, mais les cas détectés sont rares et, par conséquent, le nombre d'exploitations concernées est limité. Les réseaux de surveillance en abattoir et en équarrissage ont permis de détecter deux caprins en 2015 (1 en abattoir et 1 à l'équarrissage), aucun cas en 2016, et aucun cas en 2017. Le programme de surveillance clinique a permis l'identification d'un cas en 2015, de deux cas en 2016 et aucun cas en 2017. En revanche, le nombre de cas secondaires au sein des troupeaux concernés par les mesures de police sanitaire peut être élevé (par exemple en 2015, 37 cas secondaires issus des 2 caprins identifiés par les réseaux de surveillance en abattoir et en équarrissage troupeaux de caprins).

La prévalence de la tremblante classique a diminué de manière significative depuis 2002 (Cazeau G. *et al.* 2015, Cazeau *et al.* 2017).

Ces faibles chiffres sont toutefois à pondérer par les éléments suivants :

- le dépistage n'est réalisé que sur un échantillon limité de la population à l'abattoir et à l'équarrissage (objectifs de 5 000 ovins et de 5 000 caprins de plus de 18 mois testés à l'abattoir ; 15 000 ovins et 15 000 caprins de plus de 18 mois testés à l'équarrissage (source DGAL), sur une population de 7 036 809 ovins et 1 258 944 caprins (source base DISAR 2016) ;
- les tests de dépistage (pratiqués sur système nerveux central ; sur échantillon d'obex) ne permettent pas de détecter les animaux infectés en phase précoce d'incubation, car les prions atteignent le système nerveux central aux phases tardives de l'incubation. Au final, 50 % des animaux infectés (Afssa 2007) seraient détectés par les tests.

Dans le cas de la tremblante classique des petits ruminants, les prions responsables des formes les plus représentatives sont présents dans de nombreux tissus autres que le système nerveux central comme la rate, les ganglions mésentériques, lymphatiques ou rétropharyngiens, le placenta, le sang, le muscle, la langue et les glandes salivaires, etc. (Hadlow, Kennedy, et Race 1982, Onodera *et al.* 1993, Casalona *et al.* 2005, Vascellari *et al.* 2007, Houston *et al.* 2008). Par ailleurs, les prions de la tremblante classique ont également été identifiés au niveau des glandes mammaires de brebis co-infectées par l'agent de la tremblante et le virus visna-maëdi (Ligios *et al.* 2005). Les formations lymphoïdes secondaires et tertiaires (Heikenwalder *et al.* 2005) peuvent

être contaminées, notamment celles situées au niveau des muqueuses (i.e. digestive ou respiratoire), rendant ainsi possible l'élimination dans le milieu extérieur de l'agent de ces maladies. En effet, chez les animaux au stade clinique de la maladie, la PrP^{Sc} et/ou l'infectiosité ont été détectés dans les fèces, la salive et les urines (Tamgüney *et al.* 2012, Terry *et al.* 2011, Rubenstein *et al.* 2011).

Les prions de la tremblante classique ont également été identifiés dans le lait de brebis infectée ne présentant pas de signes cliniques et en concentration suffisante pour transmettre la maladie (Konold *et al.* 2008, Lacroux *et al.* 2008, Maddison *et al.* 2009).

Par ailleurs, des prions de la tremblante classique ont été mis en évidence dans des échantillons environnementaux comme le sol ou le matériel d'élevage ; ceux-ci peuvent persister dans le sol durant des années, sans diminution notable d'infectiosité (Gough *et al.* 2015, Maddison *et al.* 2010, Konold *et al.* 2015, Smith, Booth, et Pedersen 2011). Par le passé, la contamination de l'environnement dans les élevages a souvent été évoquée pour expliquer les résurgences de foyers de tremblante observées en Islande jusqu'à plusieurs décennies après l'application de mesures d'abattage et de désinfection (Georgsson, Sigurdarson, et Brown 2006). Toutefois, il est difficile de garantir que les animaux utilisés à l'époque pour le repeuplement des élevages étaient tous véritablement indemnes de tremblante et que, parmi ceux-là, aucun n'était en phase d'incubation.

Enfin la transmission de l'agent de la tremblante classique à des animaux placés expérimentalement dans un environnement contaminé a été rapportée : c'est le cas des pâtures, même en dehors de tout contexte d'agnelage (Dexter *et al.* 2009), des barrières et abreuvoirs (Konold *et al.* 2015, Hawkins *et al.* 2015).

Compte-tenu de :

- **la distribution de l'agent de la tremblante classique dans les tissus périphériques (autres que le système nerveux central), et dans le lait de la brebis infectée ;**
 - **la mise en évidence de prions de la tremblante classique dans l'environnement de l'élevage, ainsi que l'observation expérimentale de leur transmission dans un environnement contaminé ;**
- de l'avis des experts et en l'état actuel des connaissances, le nettoyage et la désinfection d'une exploitation de petits ruminants atteinte de tremblante classique apparaît pertinent en plus des mesures de police sanitaire en vigueur (voir paragraphe 3.2), l'environnement contaminé constituant une source de contamination au sein de l'exploitation.**

3.3.2.4 Cas de la tremblante atypique

Des cas de tremblante atypique ou Nor98 ont été décrits en Europe et en France depuis 2002, date de la mise en place des programmes européens de surveillance des EST chez les petits ruminants. Par ailleurs pour la tremblante atypique, la répartition différente de la PrP^{Sc} au sein du SNC suggère que certains cas ne sont pas détectés par un test pratiqué sur obex.

Des études rétrospectives au Royaume Uni ont démontré cependant que cette maladie n'était pas une maladie émergente car présente dès 1987 (Webb *et al.* 2009, Bruce *et al.* 2007, Foster *et al.* 2008). Ces dernières années, 10 cas ont été identifiés en France en 2015, 7 en 2016 et 5 en 2017. Les prions de la tremblante atypique peuvent être détectés dans les tissus périphériques mais à des niveaux d'infectiosité qui semblent inférieurs à ceux présents dans le cas de la tremblante classique dues à des prions lymphotropes (Andreoletti *et al.* 2011). Dans

ces tissus périphériques, l'agent est en général mis en évidence par bioessais (mesure d'infectiosité par injection à l'animal de laboratoire de l'échantillon) alors que les méthodes biochimiques (détection de la PrP^{Sc}) donnent des résultats généralement négatifs. En effet, la sensibilité analytique des bioessais pourrait être jusqu'à 4000 fois supérieure à celle des méthodes biochimiques, avec certains échantillons d'animaux atteints de tremblante atypique (Andreoletti *et al.* 2011).

Il n'existe pas de travaux mettant en évidence une excrétion de l'agent chez les animaux infectés. Néanmoins compte tenu des niveaux faibles de prion dans les tissus périphériques d'un animal infecté, cette excrétion reste peu probable. Il n'existe pas de travaux relatant la contamination de l'environnement de l'élevage.

En France, au vu des connaissances actuelles la tremblante atypique ne semble pas transmissible en conditions d'élevage (Fediaevsky *et al.* 2010, Afssa 2009) : la probabilité d'observer un cas secondaire n'est pas différente dans les troupeaux des cas index, par rapport à celle de la population générale des petits ruminants.

Compte tenu du fait que :

- **l'agent de la tremblante atypique est peu ou pas transmissible en conditions d'élevage et la prévalence intra-troupeau est faible (souvent un cas par troupeau) ;**
 - **aucune donnée n'a permis de démontrer une excrétion de l'agent de la tremblante atypique dans le milieu extérieur. Cette excrétion, si elle existe, serait sans doute bien moindre que celle de l'agent de la tremblante classique ;**
- en l'état actuel des connaissances, les experts ne sont pas en mesure de justifier la pertinence d'un nettoyage et désinfection d'une exploitation de petits ruminants infectée par l'agent de la tremblante atypique en plus des mesures de police sanitaire en vigueur (voir paragraphe 3.2).**

3.3.2.5 Cas de l'infection de petits ruminants par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ou EST non différentiable de l'ESB).

Un seul cas (caprin) a été identifié en France, en 2004. Aucun cas n'a été identifié depuis, malgré une phase visant l'exhaustivité du dépistage entre 2005 et 2007. Il faut toutefois noter que les programmes de dépistage actuels ne sont pas en mesure de détecter une très faible prévalence d'agent de l'ESB chez les petits ruminants (Anses 2014a).

Il n'existe pas de données relatives à l'excrétion des prions agents de l'ESB des ovins et caprins dans le milieu extérieur, mais les similitudes de répartition dans les organes périphériques avec les prions responsables de tremblante classique lymphotrope (Van Keulen *et al.* 2008) suggèreraient une probable contamination du milieu extérieur.

Compte-tenu de :

- **l'incertitude liée à la détection d'agent de l'ESB chez les petits ruminants par les programmes de dépistage actuels ;**
- **la répartition de l'agent de l'ESB chez les petits ruminants dans les organes périphériques, suggérant une contamination de l'environnement ;**
- **des similitudes de répartition de l'agent chez un animal infecté avec celle de l'agent de la tremblante classique ;**

de l'avis des experts et en l'état actuel des connaissances, le nettoyage et la désinfection des exploitations de petits ruminants se justifieraient dans une exploitation infectée par une souche de prion non différentiable de l'ESB, en plus des mesures de police sanitaire en vigueur (voir paragraphe 3.2).

3.3.2.6 Cas de la maladie du dépérissement chronique

La MDC n'a pour le moment jamais été identifiée en France. Une surveillance restreinte avait eu lieu pendant la période 2007-2009 dans plusieurs Etats membres suite à la décision (CE) n°182/2007¹⁶. Les résultats obtenus en France (685 analyses sur cervidés sauvages et 689 sur cervidés d'élevage) n'avaient pas permis de révéler des cas positifs. Toutefois, dans la mesure où cette maladie ne fait actuellement pas l'objet d'une surveillance, on ne peut pas exclure sa présence à faible prévalence chez les cervidés sauvages.

En Europe, la Maladie du dépérissement chronique a été identifiée pour la première fois en 2016 en Norvège. Les causes de son apparition ou de son introduction sont sujettes à hypothèses : maladie issue du continent nord-américain ou préexistante en Europe mais non détectée, importation d'animaux vivants infectés, utilisation de leurres de chasse à base d'urine contaminée, etc. Certaines recommandations ont déjà été formulées pour essayer de limiter la propagation de cette maladie au sein de l'Union européenne (EFSA 2017b).

Dans le cadre de la maladie du dépérissement chronique, les prions présentent également une distribution assez large dans les organes périphériques au sein d'un cervidé infecté, à l'instar des prions lymphotropes de tremblante classique.

Chez les animaux au stade clinique de la maladie, la PrP^{Sc} et/ou l'infectiosité ont été détectées dans les fèces, la salive et les urines, pouvant ainsi contaminer l'environnement (Tamgüney *et al.* 2009, Tamgüney *et al.* 2012, Haley *et al.* 2009, Mathiason *et al.* 2006, Rubenstein *et al.* 2011) Certains animaux placés expérimentalement dans un tel environnement contaminés s'infectent (Miller *et al.* 2004, Mathiason *et al.* 2009). Des échantillons de sols provenant d'enclos de cervidés atteints contiennent suffisamment d'infectiosité pour infecter *per os* des souris transgéniques qui expriment la PrP de cervidés (Wyckoff *et al.* 2016). Au total, la dissémination de l'agent de la maladie du dépérissement chronique chez les cervidés par l'environnement est donc effective.

Néanmoins, compte tenu de :

- **l'absence de cas avérés de cette maladie en France ;**
- **des modalités d'élevage en plein air ;**
- **de la difficulté (voire l'impossibilité) de décontaminer d'une façon efficace les parcours d'animaux dans de telles conditions d'élevage ;**

les experts ne sont pas en mesure de justifier la pertinence d'opérations visant la désinfection, d'une exploitation de cervidés infectée par l'agent de la maladie du dépérissement chronique hormis pour les bâtiments de rassemblement ou le matériel d'alimentation et d'abreuvement.

¹⁶ <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32007D0182>

En conclusion, en l'état actuel des connaissances, le nettoyage et la désinfection d'une exploitation de ruminants domestiques paraissent pertinents en cas d'infection par l'agent de :

- la tremblante classique,
- l'ESB chez les petits ruminants.

Dans le cas de la MDC, la désinfection se justifierait pour les bâtiments de rassemblement ou le matériel d'alimentation et d'abreuvement susceptibles d'exister dans certains élevages de cervidés.

En l'état actuel des données de surveillance, un nombre extrêmement limité d'exploitations seraient concernées par ce type de mesures.

3.3.3. Préconisations pour évaluer l'efficacité d'un produit biocide pour le nettoyage/désinfection d'une exploitation infectée par le danger retenu.

3.3.3.1 Résistance et inactivation des agents d'EST

La structure protéique des prions offre une très grande résistance à la plupart des procédés connus de désinfection et de stérilisation. Bien que la résistance des prions aux procédés d'inactivation physico-chimiques soit très dépendante de la souche considérée, les prions présentent globalement une forte stabilité à la chaleur sèche, certains travaux ayant rapporté la persistance d'une infectiosité à plus de 600°C (Brown *et al.* 2000). En revanche l'autoclavage à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes est un traitement reconnu par l'Organisation Mondiale de la santé (OMS).

S'agissant des traitements chimiques, il a été montré que la plupart des produits biocides désinfectants (alcool, formaldéhyde, etc.) sont inefficaces ou encore comme l'alcool et le formaldéhyde préservent le caractère infectieux des prions en agissant comme fixateur (Taylor 1999). Ils préservent leur conformation et renforcent probablement leur stabilité dans l'environnement.

Historiquement, quatre agents chimiques ont démontré, par bioessai, une réduction de plus de 4 log₁₀ du titre infectieux des EST : le chlore, certains composés phénoliques, le thiocyanate de guanidine et l'hydroxyde de sodium (Ernst et Race 1993, Manuelidis 1997). Parmi ces procédés, deux sont classiquement utilisés pour une inactivation maximale des EST : le trempage dans l'hydroxyde de sodium (soude) 1 N et le trempage dans l'hypochlorite de sodium à la concentration de 2 % de chlore actif pendant 1 heure [(circulaire n°138 du 14 mars 2001), et recommandations de l'OMS (WHO 2003)]. De manière générale, il est reconnu que le chlore présente la meilleure efficacité. Son usage est cependant limité par ses propriétés corrosives et la forte réduction de son pouvoir désinfectant en présence de matières organiques.

Plus récemment, différents oxydants ont également démontré un potentiel de réduction de plus de 4 log₁₀ du titre infectieux des EST : le dioxyde de manganèse (> 4 log₁₀) (Russo *et al.* 2009), l'ozone (> 4,1 log₁₀) (Ding *et al.* 2013) ; le « système Fenton » (> 5,2 log₁₀) (Solassol *et al.* 2006, Suyama *et al.* 2007) et l'hydrogènesulfate de potassium (> 6 log₁₀) (Chesney *et al.* 2016) .

Par ailleurs, par le passé, l'Anses a rappelé à plusieurs reprises la stabilité des prions dans le sol et le maintien de leurs capacités répliquatives au cours du temps, certains travaux suggérant même que l'adsorption des prions à certaines particules du sol potentialise parfois l'infectiosité (Anses 2014b). Dans ce dernier avis, la répartition hétérogène du prion dans l'environnement (pas de dilution attendue par unité de surface) a été évoquée. Toutefois la désinfection des pâtures ou des parcours

par utilisation de produits biocides apparaît totalement inenvisageable dans le cas des EST, à la fois pour des raisons environnementales et compte tenu de l'incertitude de l'efficacité de ces procédés sur ce type de supports (voir paragraphe 3.2 de la note 1 de l'AST 2015-SA-0178, en date du 2 décembre 2016).

3.3.3.2 Référentiels existants pour la désinfection en laboratoire et les dispositifs médicaux et possibilités d'adaptation en élevage

Il n'existe pas de norme/méthode internationale ou nationale décrivant les principes à respecter pour le nettoyage/désinfection d'une exploitation dans laquelle un cas d'EST a été identifié, lacune soulignée dans la publication de (Acín 2015).

Cependant, à défaut, différents textes sont disponibles au regard des procédés physiques et chimiques efficaces à mettre en œuvre en milieu hospitalier et/ou en laboratoire pour l'inactivation des prions :

- Conclusions du Comité d'experts sur les Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles et les Prions, octobre 1996.
- Cahier des charges DGAL pour la mise en œuvre des tests rapides de dépistage de l'ESB (version 2 du 24/11/2004).
- Publication du Conseil Supérieur d'Hygiène n°7276-2 : Recommandation pour la prévention de la transmission des encéphalopathies spongiformes transmissibles (maladie de Creutzfeldt-Jakob) en milieu hospitalier. Mai 2006.
- Circulaire DGS/DPPR no 2000/292 du 29 mai 2000 relative à diverses mesures concernant les appareils de désinfection des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés.
- Circulaire de la DGS N°2001/138 du 14 mars 2001 relative à l'efficacité des méthodes de décontamination usuelles vis-à-vis des matières infectieuses contenant des ATNC.
- Circulaire DGS/SD5C/DHOS/E2/DRT/CT1/CT2/2004/382 du 30 juillet 2004 relative aux précautions à observer dans les services d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie, les chambres mortuaires et les laboratoires de biologie « spécialisés ATNC », vis à vis du risque de transmission des agents transmissibles conventionnels (ATC) et non conventionnels (ATNC).
- Circulaire de la DGS /RI3/2011/449 du 1^{er} décembre 2011 relative à l'actualisation des recommandations visant à réduire les risques de transmission d'agents transmissibles non conventionnels lors des actes invasifs.

Comme précédemment rappelé par l'Agence (Anses 2016), la gestion d'un foyer dû à un danger sanitaire de 1^{ère} ou de 2^{ème} catégorie pour les espèces animales repose sur une suite d'opérations, depuis la suspicion de la présence du danger jusqu'à l'assainissement du foyer. Ces opérations ont pour but de réduire et d'éliminer ces dangers afin de limiter le risque de leur diffusion et de leur résurgence.

La première étape, le nettoyage, est une étape primordiale dans tout processus de réduction des risques en rapport à la réduction de la contamination par des dangers sanitaires, dont les agents d'EST.

Ainsi, il est conseillé, à condition que cela n'augmente pas le risque pour le personnel, que le matériel et l'environnement soient d'abord nettoyés, avant le commencement du processus de décontamination (WHO 1999, Rutala et Weber 2001). Cette phase de nettoyage vise à éliminer le maximum de matières organiques et minérales accumulées qui se retrouvent en quantité importante dans les locaux et sur le matériel d'élevage. La qualité de la réalisation de cette opération conditionne l'effet des produits biocides qui, d'une façon générale, voient leur efficacité diminuer en présence de souillures minérales et organiques.

Il sera important de définir des modalités de nettoyage qui n'accroissent pas la dissémination de l'agent dans l'exploitation (par exemple : proscrire le lavage à grandes eaux) et qui limitent les effluents liquides (qui devront être traités) au cours de cette phase.

Concernant l'étape de décontamination, la résistance des prions aux méthodes de décontamination courantes, doit être prise en compte (voir paragraphe précédent).

Depuis 2011, la circulaire DGS/RI3/2011/449 du 1^{er} décembre 2011, relative à « l'actualisation des recommandations visant à réduire les risques de transmission d'agents transmissibles non conventionnels lors des actes invasifs » identifie les techniques et modalités de traitement pour une inactivation maximale des agents des EST comme devant être répertoriées dans la liste des produits inactivants totaux¹⁷, telle que définie par l'ANSM suivant le Protocole Standard Prion¹⁸ en vigueur.

3.3.3.3 Exemple du protocole de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé pour la désinfection des dispositifs médicaux.

Un protocole d'évaluation de l'efficacité des produits biocides a été élaboré par l'ANSM (auparavant AFSSAPS) en 2011 pour la désinfection des dispositifs médicaux (Protocole Standard Prion ou PSP). Il reste à ce jour le seul protocole d'évaluation des biocides vis-à-vis des prions. Ce PSP avait été conçu pour évaluer l'efficacité des biocides lorsque l'agent est adsorbé sur des surfaces. Le protocole de l'ANSM est destiné à l'évaluation de produits ou de procédés utilisables pour la décontamination de dispositifs médicaux (non jetables) en médecine humaine (ex : endoscope, électrodes intracrâniennes, etc.) qui sont constitués par des surfaces souvent lisses et donc faciles à nettoyer. Compte tenu des particularités des conditions d'usage des biocides en élevage, de la diversité des supports à traiter, ce type de protocole fournit une base de réflexion mais ne peut en aucun cas être utilisé en élevage sans adaptation.

En 2011, ce protocole prévoyait :

- des essais *in vivo* sur une souche de tremblante expérimentale 263 K adaptée au Hamster
- des essais *in vitro*, sur deux souches, la souche 263 K et une souche humaine ou une souche d'origine bovine.

Ce protocole recourt à l'hypochlorite de sodium à la concentration de 2 % de chlore actif pendant 1 heure et l'hydroxyde de sodium (soude) (1N) pendant 1 heure comme des traitements de référence « inactivants totaux », auxquels sont comparés les produits biocides à évaluer, avec un objectif de réduction logarithmique de 4. D'après cette méthodologie (version 2011), une liste positive de

¹⁷ Selon la circulaire de la DGS/RI3/2011/449 du 1^{er} décembre 2011, l'inactivation est considérée comme « totale » lorsque l'infectiosité n'est plus détectable suivant les analyses réalisées en respectant les critères méthodologiques retenus dans le protocole standard prion (PSP) en vigueur

¹⁸ [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Creutzfeldt-Jakob-et-produits-de-sante/Protocole-Standard-Prion-lutte-contre-les-infections-liees-aux-soins/\(offset\)/1#paragraphe_26470](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Creutzfeldt-Jakob-et-produits-de-sante/Protocole-Standard-Prion-lutte-contre-les-infections-liees-aux-soins/(offset)/1#paragraphe_26470)

produits efficaces a été définie uniquement pour la désinfection des dispositifs médicaux. Par conséquent la liste des produits validés par l'ANSM n'est pas utilisable en l'état.

Par ailleurs, certains travaux démontrent que l'efficacité « prionicide » est directement dépendante de la souche traitée (Giles *et al.* 2008). Enfin, certains travaux ultérieurs, réalisés *in vitro* (Belondrade *et al.* 2016) suggèrent que certains produits validés par l'ANSM sont moins efficaces voire inefficaces avec d'autres souches de prions, notamment humaines (vMCJ). Suite à ces travaux, le PSP fait actuellement l'objet d'une révision.

La dernière version soumise à consultation (version provisoire 2016), prévoit notamment :

- des essais *in vivo* sur deux souches : une souche de tremblante expérimentale 263 K adaptée au Hamster et une souche humaine de type MM1 ;
- des essais *in vitro*, *a minima* sur les deux souches suivantes : une souche de tremblante expérimentale 263 K et une souche humaine de type MM1.

Pour plus de détails sur ce protocole, consulter l'Annexe 4.

En conclusion, il faut noter que ces procédés de traitement évoqués dans les paragraphes précédents sont développés pour une décontamination de surfaces propres en laboratoire, alors que la désinfection d'un foyer infectieux dans un élevage présente des difficultés particulières et reste un défi délicat.

Dans la littérature, différents procédés de traitement ont été étudiés dans des conditions proches des conditions retrouvées en élevage, mais les publications scientifiques abordant ce sujet sont peu nombreuses et sont parfois contradictoires dans leurs conclusions (Hawkins *et al.* 2015, Gough *et al.* 2015, Gough, Baker, et Maddison 2017, Pritzkow *et al.* 2018).

Enfin il faut rappeler que le ou les produits biocides désinfectants doivent être en conformité avec le règlement biocide (UE) 528/2012¹⁹.

3.3.3.4 Point d'attention sur la conception d'un protocole visant à démontrer l'efficacité des produits biocides utilisable en élevage atteint d'une EST.

Les méthodologies évoquées dans les chapitres précédents nécessitent des adaptations avant de pouvoir être utilisées pour démontrer l'efficacité d'un produit dans le domaine de l'élevage. Il apparaît donc nécessaire d'élaborer un protocole adapté aux produits qui seront utilisés pour la désinfection des élevages infectés par certaines EST.

L'élaboration d'un tel protocole nécessiterait les points d'attention suivants :

- **Choix de la méthode d'évaluation**

Des méthodes *in vitro* et *in vivo* peuvent être utilisées, qui présentent chacune des avantages et inconvénients.

Méthodes *in vivo*

Les bioessais sont basés sur l'utilisation d'implants intracrâniens mimant les surfaces à traiter chez des rongeurs de laboratoire. Ces implants sont contaminés expérimentalement avec la souche de prion d'intérêt puis traités (selon le PSP par exemple) avant implantation définitive. Les modèles

¹⁹ Règlement (UE) n°528/2012 du Parlement Européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation de produits biocides. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0528&from=fr>

potentiellement les plus sensibles seraient ici des souris transgéniques surexprimant la PrP de petits ruminants. L'avantage de ce type de modèle est de pouvoir titrer, sur une large gamme dynamique, l'infectiosité de prions difficilement ou non amplifiables par les méthodes *in vitro*, comme l'agent de la tremblante atypique. Néanmoins, pour ce dernier, les procédés de nettoyage et désinfection paraissent moins pertinents. Certains travaux récents (Pritzkow *et al.* 2018) évoquent l'emploi de sphères contaminées (prions adsorbés à leurs surfaces) et placées dans les boîtes de chaque lot de rongeurs, les animaux s'infectant ensuite au contact de ces sphères. Toutefois ce dernier type de méthode pourra difficilement garantir un abattement de 4 log₁₀ du titre infectieux par le traitement biocide, la voie de contamination orale étant peu efficace et souche dépendante. Les inconvénients des bioessais sont le délai important d'obtention des résultats (entre 6 mois et 2 ans en fonction des souches de prion), les limitations liées au matériau à étudier (dégradation, toxicité, etc.) et les aspects éthiques de ce type d'expérimentation, sachant que des méthodes substitutives *in vitro* existent.

Méthodes *in vitro*

Dans le but de réduire l'emploi d'animaux d'expérimentation (en cohérence avec le principe des 3R²⁰) ainsi que le délai d'obtention des résultats (12 à 18 mois avec des tests *in vivo*), sans pour autant risquer une perte majeure d'informations dans le cadre de la question posée, le recours exclusif à une méthode *in vitro* présentant un haut niveau de détectabilité peut être envisagé. La méthode *in vitro* présente également l'avantage de permettre la réalisation de l'évaluation directement avec les prions infectant les ruminants d'élevage et non de recourir à des prions adaptés à des animaux de laboratoire.

Enfin, il est à noter que les méthodes *in vitro* permettraient également de tester les effluents générés par les traitements des supports, ce qui revêt une importance particulière dans le cadre des traitements des bâtiments d'élevage et de l'évaluation de l'effet désinfectant du produit biocide. La PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification²¹) apparaît comme une méthode adaptée aux besoins et aux objectifs. Elle permet en effet de générer en tube à essai des niveaux d'infectiosité similaires à ceux trouvés dans un cerveau au stade terminal de la maladie et donc de tester sur une gamme dynamique des réductions d'infectiosité. D'autres méthodes telles que le RT-Qulc seraient également envisageables. Bien que cette méthode n'amplifie pas l'infectiosité du prion (elle mesure l'activité de conversion de la PrP recombinante par des assemblages de prion), elle aurait potentiellement l'avantage de pouvoir détecter des types de prions non amplifiables par PMCA. Pour ces méthodes *in vitro*, en l'absence de standardisation ou de normalisation, il est indispensable de s'assurer de la parfaite maîtrise de l'outil par le laboratoire mettant en œuvre cette technique. Cette précaution pourrait s'appuyer sur la reconnaissance par un laboratoire de référence de l'aptitude du laboratoire à réaliser ces tests.

• **Choix du critère d'efficacité à atteindre :**

Le protocole devra clairement définir le niveau attendu de réduction logarithmique de l'infectiosité. L'efficacité du produit biocide testé doit être équivalente à celle des traitements de référence (hypochlorite de sodium à 2 % de chlore actif, hydroxyde de sodium à 1N, autoclavage à 134°C pendant 18 minutes). À titre d'information dans le cadre du PSP, pour la souche 263 K, cela correspond à une réduction logarithmique d'infectiosité adsorbée sur des tiges métalliques de

²⁰ Réduire, raffiner, remplacer ; démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.

²¹ PMCA : *Protein Misfolding Cyclic Amplification*, technique *in vitro* d'amplification acellulaire du prion.

4 Log₁₀. Ce facteur de réduction dépend étroitement du titre infectieux de la souche de prion étudié et de l'efficacité d'adsorption des prions sur le support contaminé.

Ces objectifs doivent prendre en considération que les doses de prion infectantes par voie orale sont minimales : l'équivalent en infectiosité d'1 mg de cerveau infecté est capable d'infecter un bovin sur les 15 exposés à cette dose par voie orale (Wells *et al.* 2007, Konold *et al.* 2012). Pour la tremblante, dans le cas d'un isolat de tremblante classique (souche Langlade) la quantité de matériel (équivalent cerveau) permettant d'infecter par voie orale 70 % des animaux exposés est de 2 mg (Douet *et al.* 2014). Cette valeur est probablement sujette à variation compte tenu de la diversité des souches de tremblante classique. Par ailleurs, les travaux de Fryer et Mc Lean suggèrent même qu'on ne peut définir de dose minimale infectieuse (Fryer et McLean 2011).

- **Choix des souches tests de prion :**

En l'absence de souche de référence *sensu stricto* et en raison de différences de résistance aux substances chimiques entre les souches de prion, les deux critères à privilégier pour le choix de la ou des souche(s) test(s) sont le haut niveau de résistance aux substances chimiques et la possibilité de détection par la méthode *in vitro* et/ou *in vivo* retenue.

Si l'agent de la tremblante atypique est désormais la souche la plus prévalente en France et bien qu'elle semble unique au regard des éléments de caractérisation des souches d'EST, il est à noter :

- i) qu'il n'existe pas de donnée relatant sa présence dans l'environnement ;
- ii) que son amplification par PMCA n'a pas été rapportée et ;
- iii) que sa stabilité de conformation est limitée par comparaison aux autres souches (Pirisinu *et al.* 2010).

L'utilisation d'une souche d'ESB de petits ruminants, outre son niveau de prévalence extrêmement faible chez les petits ruminants, nécessiterait de réaliser l'étude en laboratoire de confinement de type L3.

Parmi les souches de tremblante classique, une souche classique lymphotrope et une souche rapide également lymphotrope (exemple de type SSBP/1) pourraient être utilisées.

- **Temps de contact, température, conditions d'application, propreté/saleté**

Comme pour l'évaluation de tout produit biocide destiné à un emploi en élevage, la prise en compte des conditions d'utilisation du produit doit conduire à intégrer dans les tests réalisés les facteurs suivants :

- la nature extrêmement variée des matériaux constituant les bâtiments et le matériel d'élevage (métaux, bois, ciment, béton, caoutchouc, etc) ;
- la nécessité de réaliser des tests en condition de haut niveau de saleté. Les surfaces à désinfecter sont souvent très poreuses et présentent fréquemment de nombreuses anfractuosités, ce qui rend difficile leur nettoyage ;
- les températures souvent basses dans les bâtiments d'élevage.

Préconisations pratiques :

Indépendamment de ce protocole d'évaluation des biocides, il faudra que les deux étapes de nettoyage et de désinfection soient accompagnées de préconisations pratiques lors de leur réalisation en élevage :

- les surfaces à désinfecter sont de préférence traitées avec du matériel absorbant qui est par la suite éliminé par incinération. Ce matériel absorbant est également utilisé pour éponger les liquides répandus ;
- pour l'élimination des déchets, des conteneurs étanches doivent être utilisés. Deux sacs/récipients mis l'un dans l'autre peuvent par exemple être utilisés, tout en ayant soin d'éviter toute contamination du récipient extérieur ;
- les déchets inactivés ou non ainsi que le matériel non recyclé doivent être dans tous les cas éliminés via la filière DASRI (déchets d'activités de soins à risques infectieux).

3.4. Conclusion du CES SABA :

En ce qui concerne les agents d'EST des ruminants présents en France, les experts estiment qu'en l'état actuel des connaissances, le nettoyage et la désinfection d'une exploitation de ruminants domestiques, après confirmation d'un foyer, paraissent pertinents en cas d'infection par l'agent de la tremblante classique ou celui de l'ESB des petits ruminants.

Dans le cas d'une exploitation de cervidés infectée par l'agent de la maladie du dépérissement chronique, la désinfection se justifierait pour les bâtiments de rassemblement ou le matériel d'alimentation et d'abreuvement susceptibles d'exister dans certains de ces élevages.

En l'état actuel des données de surveillance, un nombre extrêmement limité d'exploitations seraient concernées par ce type de mesures.

Néanmoins, la désinfection des pâtures ou des parcours par utilisation de produits biocides apparaît totalement inenvisageable, à la fois pour des raisons environnementales et compte tenu de l'incertitude de l'efficacité de ces procédés sur ce type de supports dans le cas des EST.

Il n'existe toutefois pas de norme CEN de désinfection pour ces dangers sanitaires et les autres méthodologies disponibles nécessitent des adaptations avant de pouvoir être utilisées pour démontrer l'efficacité d'un produit biocide dans le domaine de l'élevage. Il apparaît donc nécessaire d'élaborer un protocole adapté à la désinfection en élevage. Ce protocole devrait prendre en compte les points d'attentions qui ont été abordé par les experts : méthode d'évaluation, critère d'efficacité, souche utilisée, temps de contact et de température.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES SABA, elle souligne en particulier l'importance d'entamer une réflexion sur un protocole visant à démontrer l'efficacité des produits biocides utilisables en élevage atteint d'une EST.

Dr. Roger Genet

MOTS-CLES

Prions, prion, ATNC, police sanitaire, EST, ESST, biocides, désinfection, élevage, dangers sanitaires, règlement UE biocides

KEYWORDS

Prions, prion, NCTA, animal health, TSE, TSSE, biocides, disinfection, farming, notifiable diseases, EU Biocides Regulation

BIBLIOGRAPHIE

➤ Publications

- Acín, C. 2015. "Scrapie: A particularly persistent pathogen." *Veterinary Record* 176 (4):97-98. doi: 10.1136/vr.h305.
- Afssa. 2007. "Avis relatif à "l'évaluation de la sensibilité diagnostique des tests rapides réalisés chez les petits ruminants sur un échantillon d'obex" (saisine 2007-SA-371) en date du 5 décembre 2007."
- Afssa. 2009. "Avis relatif aux "conséquences de deux nouvelles études scientifiques sur les mesures de police sanitaire en cas de tremblante atypique" (Saisine n° 2009-SA-0032) avis en date du 23 Juillet 2009."
- Andreoletti, O., L. Orge, S. L. Benestad, V. Beringue, C. Litaize, S. Simon, A. Le Dur, H. Laude, H. Simmons, S. Lugan, F. Corbiere, P. Costes, N. Morel, F. Schelcher, et C. Lacroux. 2011. "Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues." *PLoS Pathog* 7 (2):e1001285. doi: 10.1371/journal.ppat.1001285.
- Angers, R., J. Christiansen, A. V. Nalls, H. E. Kang, N. Hunter, E. Hoover, C. K. Mathiason, M. Sheetz, et G. C. Telling. 2014. "Structural effects of PrP polymorphisms on intra- and interspecies prion transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (30):11169-74. doi: 10.1073/pnas.1404739111.
- Anses. 2010. "Avis relatif à "la politique de sélection génétique des ovins à long terme pour la résistance aux EST" (saisine 2009-SA-0168 et 2010-SA-0005) en date du 13 Juillet 2010."
- Anses. 2012a. "Avis relatif à "certaines mesures de la police sanitaire des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST)" (Saisine n° 2011-SA-0064) en date du 13 mars 2012."
- Anses. 2012b. "Avis relatif à "la politique de sélection génétique des ovins à long terme pour la résistance aux EST" (Saisine n° 2011-SA-0227) en date du 25 juillet 2012."
- Anses. 2014a. "Avis relatif à "l'évolution du dispositif de surveillance des EST des petits ruminants" (Saisine n°2014-SA-0032) en date du 30 septembre 2014."
- Anses. 2014b. "Avis relatif à "la question de l'épandage des boues et de la gestion du risque liés aux agents transmissibles non conventionnels (ATNC)" (saisine 2012 SA 0146) en date du 3 février 2014."
- Anses. 2015. "Avis relatif à « la valorisation des tissus adipeux récoltés sur les carcasses de ruminants en alimentation animale » (saisine 2015-SA-0158) en date du 29 juin 2015."
- Anses. 2016. "Note d'appui scientifique et technique relatif à l'évaluation de l'efficacité des produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection lors de dangers sanitaires (saisine N°2015-SA-178) en date du 2 décembre 2016 ".
- Anses. 2017. "Avis de l'Anses relatif à l'allègement des matériels à risques spécifiés (MRS) pour les petits ruminants (ovins et caprins) (saisine n° 2017-SA-0037) en date du 20 mars 2017."
- Belondrade, M., S. Nicot, V. Beringue, J. Coste, S. Lehmann, et D. Bougard. 2016. "Rapid and highly sensitive detection of variant Creutzfeldt - Jakob disease abnormal prion protein on steel

- surfaces by protein misfolding cyclic amplification: Application to prion decontamination studies." *PLoS one* 11 (1). doi: 10.1371/journal.pone.0146833.
- Benestad, S L., J-N. Arsac, W. Goldmann, et M. Nöremark. 2008. "Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology." *Veterinary research* 39 (4):1-14.
- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schönheit, M. A. Tranulis, et B. Bratberg. 2003. "Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98." *Veterinary Record* 153 (7):202-208. doi: 10.1136/vr.153.7.202.
- Beringue, V., J. L. Vilotte, et H. Laude. 2008. "Prion agent diversity and species barrier." *Vet Res* 39 (4):47. doi: 10.1051/vetres:2008024.
- Brown, P., E. H. Rau, B. K. Johnson, A. E. Bacote, C. J. Gibbs Jr, et D. C. Gajdusek. 2000. "New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: Threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7):3418-3421. doi: 10.1073/pnas.050566797.
- Bruce, ME., R. Nonno, J. Foster, W. Goldmann, M. Di Bari, E. Esposito, SL. Benestad, N. Hunter, et U. Agrimi. 2007. "Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989." *Veterinary Record* 160 (19):665.
- Casalone, C., C. Corona, M I. Crescio, F. Martucci, M. Mazza, G. Ru, L. Bozzetta, P L. Acutis, et M. Caramelli. 2005. "Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie." *Journal of virology* 79 (9):5847-5849.
- Cazeau G., Perrin J.B., Loywyck V., Bouffartigue B., et Calavas D. 2015. "Surveillance des encéphalopathies spongiformes des petits ruminants en 2014 : aucun foyer de tremblante classique détecté." *Bulletin épidémiologique ANSES/DGAI* (n°71/Spécial MRE - Bilan 2014.).
- Cazeau, G., P. Chasset, V. Loywyck, B. Bouffartigue, et D. Calavas. 2017. "Surveillance des encéphalopathies spongiformes des petits ruminants en 2015 : trois cas de tremblante classique et dix cas de tremblante atypique dans un contexte de diminution de la prévalence de ces deux maladies." *Bulletin épidémiologique ANSES/DGAI* (Spécial MRE. Bilan 2015).
- Chesney, A R., C J. Booth, C B. Lietz, L. Li, et J A. Pedersen. 2016. "Peroxymonosulfate rapidly inactivates the disease-associated prion protein." *Environmental science & technology* 50 (13):7095-7105.
- Dexter, G., S C. Tongue, L. Heasman, S J. Bellworthy, A. Davis, S J. Moore, M M. Simmons, A R. Sayers, H A. Simmons, et D. Matthews. 2009. "The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock." *BMC veterinary research* 5 (1):38.
- Ding, N., N F. Neumann, L M. Price, S L. Braithwaite, A. Balachandran, G. Mitchell, M. Belosevic, et M G. El-Din. 2013. "Kinetics of ozone inactivation of infectious prion protein." *Applied and environmental microbiology* 79 (8):2721-2730.
- Douet, J. Y., C. Lacroux, F. Corbiere, C. Litaise, H. Simmons, S. Lugan, P. Costes, H. Cassard, J. L. Weisbecker, F. Schelcher, et O. Andreoletti. 2014. "PrP expression level and sensitivity to prion infection." *J Virol* 88 (10):5870-2. doi: 10.1128/JVI.00369-14.
- EFSA. 2014a. "Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats." *EFSA Journal* 2014;12(7):3781, 155 pp.
- EFSA. 2014b. "Scientific report of EFSA protocol for further laboratory investigations into the distribution of infectivity of Atypical." *EFSA Journal* 2014;12(7):3798.
- EFSA. 2017a. "The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2016." *EFSA Journal* 2017;15(11):5069:68.
- EFSA. 2017b. "Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on Chronic wasting disease (CWD) in cervids." *EFSA Journal* 2017;15(1):4667.
- EFSA. 2017c. "Scientific opinion of Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) : Bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases born after the total feed ban." *EFSA Journal* 2017;15(7):4885:45.
- Eloit, M., K. Adjou, M. Culpier, J. J. Fontaine, R. Hamel, T. Lilin, S. Messiaen, O. Andreoletti, T. Baron, A. Bencsik, A. G. Biacabe, V. Beringue, H. Laude, A. Le Dur, J. L. Vilotte, E. Comoy, J.

- P. Deslys, J. Grassi, S. Simon, F. Lantier, et P. Sarradin. 2005. "BSE agent signatures in a goat." *Vet Rec* 156 (16):523-4.
- Ernst, D. R., et R. E. Race. 1993. "Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods." *J Virol Methods* 41 (2):193-201.
- Fediaevsky, A., C. Maurella, M. Nöremark, F. Ingravalle, S. Thorgeirsdottir, L. Orge, R. Poizat, M. Hautaniemi, B. Liam, et D. Calavas. 2010. "The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries." *BMC veterinary research* 6 (1):9.
- Foster, J., L. Toovey, C. McKenzie, A. Chong, D. Parnham, D. Drummond, et N. Hunter. 2008. Atypical scrapie in a sheep in a closed UK flock with endemic classical natural scrapie. : British Medical Journal Publishing Group.
- Fryer, H R., et A R. McLean. 2011. "There is no safe dose of prions." *PloS one* 6 (8):e23664.
- Georgsson, G., S. Sigurdarson, et P. Brown. 2006. "Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years." *Journal of General Virology* 87 (12):3737-3740.
- Giles, K., D V. Glidden, R. Beckwith, R. Seoanes, D. Peretz, S J. DeArmond, et S B. Prusiner. 2008. "Resistance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to inactivation." *PLoS pathogens* 4 (11):e1000206.
- Gough, K C., C A. Baker, H A. Simmons, S A. Hawkins, et B C. Maddison. 2015. "Circulation of prions within dust on a scrapie affected farm." *Veterinary research* 46 (1):40.
- Gough, KC., CA. Baker, et BC. Maddison. 2017. "An *in vitro* model for assessing effective scrapie decontamination." *Veterinary microbiology* 207:138-142.
- Hadlow, WJ., RC. Kennedy, et RE. Race. 1982. "Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus." *Journal of Infectious diseases* 146 (5):657-664.
- Haley, N J., D M. Seelig, M D. Zabel, G C. Telling, et E A. Hoover. 2009. "Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay." *PloS one* 4 (3):e4848.
- Hawkins, S AC., H A. Simmons, K C. Gough, et B C. Maddison. 2015. "Persistence of scrapie infectivity within a farm environment after cleaning and decontamination." *Veterinary Record* 176 (4):99.
- Heikenwalder, M., N. Zeller, H. Seeger, M. Prinz, P. C. Klohn, P. Schwarz, N. H. Ruddle, C. Weissmann, et A. Aguzzi. 2005. "Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions." *science* 307 (5712):1107-10. doi: 10.1126/science.1106460.
- Houston, F., S. McCutcheon, W. Goldmann, A. Chong, J. Foster, S. Sisó, L. González, M. Jeffrey, et N. Hunter. 2008. "Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep." *Blood* 112 (12):4739-4745.
- Konold, T., M. E. Arnold, A. R. Austin, S. Cawthraw, S. A. Hawkins, M. J. Stack, M. M. Simmons, A. R. Sayers, M. Dawson, J. W. Wilesmith, et G. A. Wells. 2012. "Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle - an update." *BMC Res Notes* 5:674. doi: 10.1186/1756-0500-5-674.
- Konold, T., S AC. Hawkins, L C. Thurston, B C. Maddison, K C. Gough, A. Duarte, et H A. Simmons. 2015. "Objects in contact with classical scrapie sheep act as a reservoir for scrapie transmission." *Frontiers in veterinary science* 2:32.
- Konold, T., S. J. Moore, S. J. Bellworthy, et H. A. Simmons. 2008. "Evidence of scrapie transmission via milk." *BMC Vet Res* 4:14. doi: 10.1186/1746-6148-4-14.
- Lacroux, C., S. Simon, S L. Benestad, S. Mailliet, J. Mathey, S. Lugan, F. Corbière, H. Cassard, P. Costes, et D. Bergonier. 2008. "Prions in milk from ewes incubating natural scrapie." *PLoS pathogens* 4 (12):e1000238.
- Ligos, C., C J. Sigurdson, C. Santucci, G. Carcassola, G. Manco, M. Basagni, C. Maestrale, M G. Cancedda, L. Madau, et A. Aguzzi. 2005. "PrP Sc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis." *Nature medicine* 11 (11):1137.
- Maddison, B C., C A. Baker, L A. Terry, S J. Bellworthy, L. Thorne, H C. Rees, et K C. Gough. 2010. "Environmental sources of scrapie prions." *Journal of virology* 84 (21):11560-11562.

- Maddison, BC., CA. Baker, HC. Rees, LA. Terry, L. Thorne, SJ. Bellworthy, GC. Whitlam, et KC. Gough. 2009. "Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep." *Journal of virology* 83 (16):8293-8296.
- Manuelidis, L. 1997. "Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease and other transmissible agents." *J Neurovirol* 3 (1):62-5.
- Mathiason, C K., J G. Powers, S J. Dahmes, D A. Osborn, K V. Miller, R J. Warren, G L. Mason, S A. Hays, J. Hayes-Klug, et D M. Seelig. 2006. "Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease." *science* 314 (5796):133-136.
- Mathiason, C K., S A. Hays, J. Powers, J. Hayes-Klug, J. Langenberg, S J. Dahmes, D A. Osborn, K V. Miller, R J. Warren, et G L. Mason. 2009. "Infectious prions in pre-clinical deer and transmission of chronic wasting disease solely by environmental exposure." *PloS one* 4 (6):e5916.
- Miller, M W., E S. Williams, N T. Hobbs, et L L. Wolfe. 2004. "Environmental sources of prion transmission in mule deer." *Emerging infectious diseases* 10 (6):1003.
- Onodera, T., T. Ikeda, Y. Muramatsu, et M. Shinagawa. 1993. "Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan." *Microbiology and immunology* 37 (4):311-316.
- Pirisinu, L., M. Di Bari, S. Marcon, G. Vaccari, C. D'Agostino, P. Fazzi, E. Esposito, R. Galeno, J. Langeveld, et U. Agrimi. 2010. "A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant PrPSc." *PloS one* 5 (9):e12723.
- Pritzkow, S., R. Morales, A. Lyon, L. Concha-Marambio, A. Urayama, et C. Soto. 2018. "Efficient prion disease transmission through common environmental materials." *Journal of Biological Chemistry:jbc*. M117. 810747.
- Richt, J A., et S M. Hall. 2008. "BSE case associated with prion protein gene mutation." *PLoS pathogens* 4 (9):e1000156.
- Robinson, S. J., M. D. Samuel, K. I. O'Rourke, et C. J. Johnson. 2012. "The role of genetics in chronic wasting disease of North American cervids." *Prion* 6 (2):153-62. doi: 10.4161/pri.19640.
- Rubenstein, R., B. Chang, P. Gray, M. Piltch, M S. Bulgin, S. Sorensen-Melson, et M W. Miller. 2011. "Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease." *Journal of virology* 85 (17):9031-9038.
- Russo, F., C. J. Johnson, C. J. Johnson, D. McKenzie, J. M. Aiken, et J. A. Pedersen. 2009. "Pathogenic prion protein is degraded by a manganese oxide mineral found in soils." *J Gen Virol* 90 (Pt 1):275-80. doi: 10.1099/vir.0.003251-0.
- Rutala, W. A., et D. J. Weber. 2001. "Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilization." *Clin Infect Dis* 32 (9):1348-56. doi: 10.1086/319997.
- Sala, C., E. Morignat, N. Oussaid, E. Gay, D. Abrial, C. Ducrot, et D. Calavas. 2012. "Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform encephalopathy in France." *BMC Vet Res* 8:74. doi: 10.1186/1746-6148-8-74.
- Smith, C B., C J. Booth, et J A. Pedersen. 2011. "Fate of Prions in Soil: A Review All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher." *Journal of environmental quality* 40 (2):449-461.
- Solassol, J., M. Pastore, C. Crozet, V. Perrier, et S. Lehmann. 2006. "A novel copper-hydrogen peroxide formulation for prion decontamination." *The Journal of infectious diseases* 194 (6):865-869.
- Spiropoulos, J., R. Lockey, R. E. Sallis, L. A. Terry, L. Thorne, T. M. Holder, K. E. Beck, et M. M. Simmons. 2011. "Isolation of prion with BSE properties from farmed goat." *Emerg Infect Dis* 17 (12):2253-61. doi: 10.3201/eid1712.110333.

- Suyama, K., M. Yoshioka, M. Akagawa, Y. Murayama, H. Horii, M. Takata, T. Yokoyama, et S. Mohri. 2007. "Assessment of prion inactivation by fenton reaction using protein misfolding cyclic amplification and bioassay." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71 (8):2069-2071.
- Tamgüney, G., M W. Miller, L L. Wolfe, T M. Sirochman, D V. Glidden, C. Palmer, A. Lemus, S J. DeArmond, et S B. Prusiner. 2009. "Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces." *Nature* 461 (7263):529.
- Tamgüney, G., J A. Richt, A N. Hamir, J J. Greenlee, M W. Miller, L L. Wolfe, T M. Sirochman, A J. Young, D V. Glidden, et N L. Johnson. 2012. "Salivary prions in sheep and deer." *Prion* 6 (1):52-61.
- Taylor, DM. 1999. "Inactivation of prions by physical and chemical means." *Journal of Hospital Infection* 43:S69-S76.
- Terry, L A., L. Howells, K. Bishop, C A. Baker, S. Everest, L. Thorne, B C. Maddison, et K C. Gough. 2011. "Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie." *Veterinary research* 42 (1):65.
- Van Keulen, L J M., M E W. Vromans, C H. Dolstra, A. Bossers, et F G. Van Zijderveld. 2008. "Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep." *Archives of virology* 153 (3):445-453.
- Vascellari, M., R. Nonno, F. Mutinelli, M. Bigolaro, M A. Di Bari, E. Melchiotti, S. Marcon, C. D'Agostino, G. Vaccari, et M. Conte. 2007. "PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep." *Journal of virology* 81 (9):4872-4876.
- Webb, P R., L. Powell, M. Denyer, S. Marsh, C. Weaver, M M. Simmons, E. Johns, J. Sheehan, P. Horsfield, et C. Lyth. 2009. "A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21 (6):826-829.
- Wells, G. A., T. Konold, M. E. Arnold, A. R. Austin, S. A. Hawkins, M. Stack, M. M. Simmons, Y. H. Lee, D. Gavier-Widen, M. Dawson, et J. W. Wilesmith. 2007. "Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle." *J Gen Virol* 88 (Pt 4):1363-73. doi: 10.1099/vir.0.82421-0.
- WHO. 1999. "Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies. Report of a WHO consultation Geneva, Switzerland, 23-26 March 1999."
- WHO. 2003. "Manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease, 2003."
- Wyckoff, A. C., S. Kane, K. Lockwood, J. Seligman, B. Michel, D. Hill, A. Ortega, M. R. Mangalea, G. C. Telling, M. W. Miller, K. Vercauteren, et M. D. Zabel. 2016. "Clay Components in Soil Dictate Environmental Stability and Bioavailability of Cervid Prions in Mice." *Front Microbiol* 7:1885. doi: 10.3389/fmicb.2016.01885.

➤ **Textes réglementaires**

Arrêté du 3 décembre 1990 fixant les mesures de police sanitaire relatives à l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB chez les bovins).

Arrêté du 2 juillet 2009 fixant les mesures de police sanitaires relatives aux EST ovines (version en vigueur).

Arrêté du 2 juillet 2009 fixant les mesures de police sanitaires relatives aux EST caprines (version en vigueur).

Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles.

Règlement (UE) n°528/2012 du Parlement Européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation de produits biocides.

ANNEXE 1 PRESENTATION DES INTERVENANTS

PREAMBULE : Les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, en fonction de leur domaine de compétence, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE RAPPORTEURS

Membres

M. Jean-Noel ARSAC – Anses - Compétences EST, prions

M. Vincent BERINGUE – INRA - Compétences EST, prions

Mme Jaqueline VIALARD – Anses – Compétences en maladies animales (dont EST), diagnostic, épidémiologie.

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES SABA du 8 mars 2018.

Président

M. Etienne THIRY – Faculté de médecine vétérinaire de Liège (BE) – Compétences en virologie, immunologie.

Membres

Mme Suzanne BASTIAN – ONIRIS Nantes – Compétences en épidémiologie, bactériologie, parasitologie.

Mme Catherine BELLOC - ONIRIS Nantes – Compétences en Médecine des animaux d'élevage, monogastriques.

M. Alain BOISSY – INRA – Compétences en éthologie, bien-être animal, ruminants, zootechnie.

M. Jordi CASAL - Universitat Autònoma de Barcelona (ES) – Compétences en zoonose, épidémiologie quantitative, maladies animales exotiques, analyse quantitative des risques.

M. Christophe CHARTIER – ONIRIS Nantes – Compétences en parasitologie, maladie des petits ruminants, technique d'élevage, épidémiologie.

M. Eric COLLIN – Vétérinaire praticien – Compétences en maladie des ruminants.

M. Frédéric DELBAC – CNRS – Compétences en abeilles, épidémiologie, parasitologie, microbiologie.

Mme Barbara DUFOUR – ENV Alfort – Compétences en épidémiologie, maladies infectieuses, maladie des ruminants.

M. Guillaume FOURNIÉ - Royal Veterinary College (UK) – Compétences en évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie.

- M. Jean-Pierre GANIÈRE – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, réglementation, zoonoses.
- M. Dominique GAUTHIER - Laboratoire départemental 05 – Compétences en faune sauvage, lagomorphes, méthodes de diagnostic.
- M. Etienne GIRAUD – INRA – Compétences en antibiorésistance, environnement, approche globale de la santé animale.
- M. Jacques GODFROID - Université Arctique de Norvège (NO) – Compétences en évaluation des risques, zoonose, épidémiologie, tuberculose, bactériologie, faune sauvage marine.
- M. Jean-Luc GUÉRIN – ENVT – Compétences en maladie des volailles et lagomorphes, immunologie, virologie, zoonose et santé publique.
- M. Jean GUILLOTIN – Laboratoire départemental 59 – Généraliste, compétences en méthodes de diagnostic, porcs, faune sauvage.
- Mme Nadia HADDAD – Anses UMR BIPAR, ENV Alfort – Compétences en microbiologie, épidémiologie, maladies contagieuses.
- M. Jean HARS – Office national de la chasse et de la faune sauvage – Compétences en maladie de la faune sauvage libre, épidémiologie.
- Mme Véronique JESTIN – Ex-directrice de recherche et ex-responsable d'unité et du Laboratoire National de Référence Influenza aviaire, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (virologie, infectiologie, pathologie aviaire, vaccinologie, méthodes de diagnostic, analyse de risque).
- Mme Elsa JOURDAIN – INRA – Compétences en zoonoses, épidémiologie quantitative, faune sauvage.
- Mme Claire LAUGIER – Anses Dozulé – Compétences en maladie équine, diagnostic de laboratoire.
- Mme Monique L'HOSTIS – Ex-Professeur à Oniris – Généraliste, compétences en parasitologie, abeilles, faune sauvage.
- Mme Coralie LUPO – IFREMER – Compétences en épidémiologie, maladies aviaire et aquacole.
- M. Gilles MEYER – ENV Toulouse – Compétences en maladie des ruminants, virologie.
- M. Pierre MORMÈDE – INRA Toulouse – Compétences en génétique du stress, endocrinologie, bien-être animal.
- Mme Carine PARAUD – Anses – Compétences en statistiques, maladie des petits ruminants, parasitologie de terrain.
- Mme Claire PONSART – Anses – Compétences en épidémiologie, bactériologie, statistiques, virologie, maladie de la reproduction.
- Mme Nathalie RUVOEN – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, zoonoses, réglementation
- M. Claude SAEGERMAN – Faculté de médecine vétérinaire de Liège – Compétences en épidémiologie, maladies contagieuses, maladies émergentes.
- M. Stéphan ZIENTARA – Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort – Compétences en virologie.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Florence ETORE – Chef d'Unité adjointe – Anses Direction de l'évaluation des risques (DER),
Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux

M. Thomas MAIGNIEN - Coordinateur Scientifique - Anses Direction de l'évaluation des risques
(DER), Unité d'évaluation des risques liés aux aliments.

Equipe projet

Mme Isabelle ATTIG – Chef d'Unité - Anses Direction de l'évaluation des produits réglementés
(DEPR), Unité d'Evaluation de l'Efficacité des Biocides -U2EB

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET - Anses

ANNEXE 3

Tableau 1 : Caractéristiques des dangers sanitaires prions

Type d'EST	Nombres cas ou exploitations concernées par an	Nature des matières virulentes (MV)		Facteurs de variabilité de l'infectiosité inter-souches	Facteurs de variabilité de l'infectiosité des MV lié à l'animal infecté
Explications, exemples		A virulence ouverte	à virulence fermée mais susceptibles de devenir ouverte (via traite, ponctions, débridement ou traumatisme)		
		= sécrétions ou excréments naturellement éliminés dans le milieu extérieur (matières fécales, urine, expectorations, jetage, larmes, sueur, produits de la sphère génitale - lochies, placenta)	i.e : liquide articulaire, sang, liquide céphalorachidien, pus	Description de variabilité d'infectiosité des MV en fonction de la souche impliquée (uniquement chez l'espèce cible) - Si oui, préciser le type et le degré de variabilité	i.e espèce de petits ruminants infectée, âge, génotypage (préciser quelle MV est impactée et de quelle manière)
ESB classique (BV)	2014 : 0 2015 : 0 2016 : 1 (équar) 2017 : 0	Non démontrée, Distribution périphérique réduite	Sang	Unicité Potentiel zoonotique démontré	Non identifié
ESB atypiques (H ou L) (bovins)	2014 : 3 (2 type L et 1 type H) 2015 : 0 2016 : 3 (type H) 2017 : 2 (1 type L et 1 typeH)	Non démontrée, Distribution périphérique réduite	Non démontrée	2 souches (H et L) Potentiel zoonotique pour ESB-L	Non identifié
Tremblantes classiques (OV ou CP)	2014 : 28 (28 OV (PS)) 2015 : 40 (39 CP (1 abat + 1 équar + 37 PS) + 1 OV (surv. clinique)) 2016 : 2 OV (surv. clinique) 2017 : 0	Urine (sur modèle hamster), Lait (sur mouton clinique et préclinique), Feces (sur mouton clinique et préclinique), Salive (sur mouton préclinique), Placenta (sur mouton clinique et préclinique), Peau (sur mouton clinique)	Sang	Diversité des isolats	Génotype Stade de la maladie
Tremblante atypique (OV ou CP)	2014 : 11 (5 CP (équar) + 6 OV (4 équar + 1 abat + 1 PS)) 2015 : 10 (5 CP (4 équar + 1 abat)) + 5 OV (4 équar + 1 abat)) 2016 : 7 (3 CP (équar) + 4 OV (1 abat + 3 équar)) 2017 : 4 (2 CP (équar) + 2 OV (1 CSO + 1 équar))	Non démontrée, mais peu probable compte tenu de la distribution périphérique réduite	Non démontrée	Unicité	Non identifié
ESB chez petits ruminants	2014 : 0 2015 : 0 2016 : 0 2017 : 0 Rappel cas publiés : 1 cas en France en 2005 et 1 au RU en 2011	Non démontrée mais probable du fait de la large distribution périphérique	Sang	Unicité Potentiel zoonotique démontré	Génotype Stade de la maladie
Maladie du dépérissement chronique	Non recherché				

Type d'EST	Niveau d'infectiosité des MV	Durée d'émission de l'agent dans les MV	Dose infectante	Preuves de contamination par le milieu extérieur		Description éventuelle de présence de prion dans le sol, l'eau, ou biofilms ...
				Preuves "indirectes"	preuves "directes"	
<i>Explications, exemples</i>	<i>Classer les MV par ordre de virulence croissante, préciser les niveaux si connus</i>	<i>indiquer si c'est de l'ordre de jour(s), de mois ou d'année(s) pour chaque MV</i>	<i>indiquer quelle est la dose infectante minimale ayant permis la reproduction expérimentale de la maladie</i>	<i>Publications faisant état de contamination d'animaux à partir du milieu extérieur - préciser la nature de l'élément environnemental mis en cause (sol, matériel d'élevage, eau, air, pâtures ...) et les conclusions sur la durée de persistance du prion dans le milieu extérieur</i>	<i>Publications faisant état d'une détection par analyse de la présence de prion dans des composants de l'environnement des animaux (sol, eau, surfaces de matériel,...)</i>	
ESB classique (BV)	Non démontrée	-		Contamination environnementale non démontrée (mais non exclue)		
ESB atypiques (H ou L) (bovins)	Non démontrée,	-		Contamination environnementale non démontrée (mais non exclue)		
Tremblantes classiques (OV ou CP)	Démontré pour le sol, les clôtures, les caniveaux, les portes, les cloisons, les auges, les poteaux de grattage, les poussières (Maddison, 2010; Konold, 2015; Gough, 2015)	En amont de l'identification des signes cliniques		Sources environmental de scrapie (Georgsson, 2006; Maddison, 2010; Hourrigan, 1996) Etudes de facteurs de risques (McIntyre, 2006) Epidemiologie, models (Touzeau 2006; Woolhouse 1998; Healy 2004) Résurgence de scrapie (Georgsson 2008; Georgsson 2007)		Fixation du Prion au sol: migration de l'agent infectieux minimal et immobilisation (Johnson, 2006; Johnson, 2007; Seidel, 2007; Jacobson, 2009; Saunders, 2009) Propriétés biologiques modifiées après fixation au sol (Johnson, 2007)
Tremblante atypique (OV ou CP)	Non démontrée	-		Contamination environnementale non démontrée (mais non exclue)		
ESB chez petits ruminants	Non démontrée	-		Possibilité d'une contamination environnementale non démontrée, mais transmissibilité entre individus possible (in utero ou périnatale)		
Maladie du dépérissement chronique						

BV = bovin ; CP = caprin ; OV = ovin ; MV = matière virulente ; équar. = équarrissage ; PS = police sanitaire ; surv. = surveillance ; RU = Royaume Uni

ANNEXE 4

Description du protocole de l'ANSM (version novembre 2011)

L'évaluation des performances des produits repose sur la réalisation de méthodes *in vivo* et *in vitro*. Dans les deux cas, le protocole repose sur la contamination d'un support (fil d'acier inoxydable) par un homogénat de cerveau infecté par une souche de prion de référence (prions de hamster 263 K dans le protocole de l'ANSM). Le support est traité avec le produit à tester et l'évaluation est réalisée par comparaison de ses performances avec au moins deux traitements chimiques inactivants totaux, l'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante et l'immersion dans l'eau de Javel 20 000 ppm pendant 1 heure à température ambiante, et un traitement inactivant physique (autoclavage à 134° sous 3 bars de pression pendant 18 minutes). Généralement un traitement partiellement efficace est appliqué en parallèle afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude. Ces témoins internes d'efficacité partielle sont basés sur des dilutions ou des temps d'action réduits par rapport à ceux des traitements comparateurs. La méthode *in vivo* repose sur l'implantation intracérébrale du support contaminé à des hamsters syriens âgés de 6 à 8 semaines, le support étant laissé à demeure pendant toute la durée de l'étude. Le protocole nécessite l'emploi d'un nombre minimal de 60 animaux, qui sont euthanasiés après 12 à 18 mois d'une surveillance bihebdomadaire visant à noter l'apparition éventuelle de signes cliniques. Le cerveau de chaque animal est prélevé pour une recherche de la forme pathologique de la PrP. La réduction d'infectiosité (RF) obtenue avec le produit ou le procédé à tester est comparée avec les RF des traitements comparateurs d'efficacité maximale et d'efficacité partielle.

Le test *in vitro* vient en complément du test *in vivo* décrit supra. Il n'est pas décrit précisément dans le protocole ANSM mais repose sur le principe d'une analyse biochimique visant à détecter la PrP.