

Efficacité des STERRADs vis-à-vis des Prions

Etudes *in vitro* & *In vivo*



Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles _ ESST

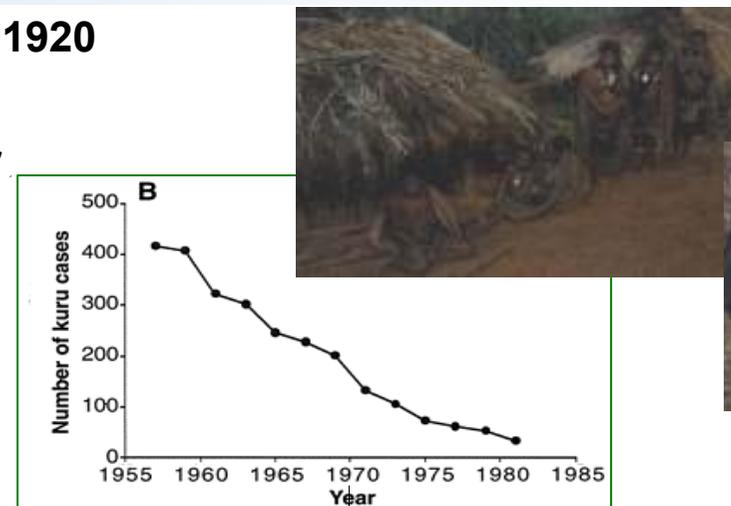
ANIMAUX

- Tremblante naturelle du mouton et de la chèvre – Europe – 1732
- Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB, 180 000 cas – plus de 900 000 bovins contaminés) – RU – 1985
- Encéphalopathie Spongiforme Féline (FSE) – 1990
- Chronic Wasting Disease (CWD) – considérée comme ESST depuis 1978



HOMME

- Maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) – Europe – 1920
- Kuru – Nouvelle Guinée – 1951
- Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- Insomnie Fatale Familiale (IFF)
- Variant de la MCJ (vMCJ) – 1995



ESST: Caractéristiques

- **Transmissibles mais pas contagieuses**
- **Période d'incubation longue et cliniquement silencieuse**
 - Age médian pour évolution clinique : 62 vs. 29 ans pour vMCJ
 - Durée de la maladie également différente : 14 mois pour vMCJ
- **Neurodégénérescence du système nerveux central (SNC)**
- **Evolution clinique sans rémission et rapidement mortelle**
- **Lésions anatomopathologiques limitées au système nerveux central**
- **Absence de réaction inflammatoire ou immunitaire ou de démyélinisation du SNC**
- **Aucune structure évocatrice d'un microorganisme dans le SNC**

Prions : Problèmes majeurs

- **Distribution périphérique (vMCJ)**
- **Absence d'une méthode diagnostic non-invasive validatée, en particulier lors de la phase asymptomatique de la maladie**
- **Extrême résistance aux procédés classiques de décontamination**

Prions : inactivation

Chaleur sèche

- **180°C pendant 24 heures : infectiosité résiduelle encore détectable**
- **320°C pendant 1 heure : infectiosité résiduelle encore détectable**
- **600°C pendant 15 minutes : infectiosité résiduelle encore détectable**

(Brown, 2000)

Probablement reliée à la nature protéique des prions

« Risque Prions »

L'incidence de la vMCJ au RU décroît mais le nombre de cas reste incertains.

Alors que les autres pays n'ont pas été impliqués au même niveau, ils identifient encore de nouveaux cas e.g. Espagne.

Si les précautions prises pour prévenir l'entrée de matériel à risque dans la chaîne alimentaire sont efficaces, reste les cas de transmissions secondaires « Homme-Homme ».

Le risque de transmission au cours d'un acte chirurgical reste préoccupant, bien qu'à ce jour aucun cas n'a été mis en évidence.

 **Besoin d'identifier de nouvelles méthodologies efficaces contre les prions et compatibles avec surfaces des instruments**

Etudes “STERRAD” : Objectifs

- **Comparer l'efficacité vis-à-vis des prions de différentes générations de stérilisateurs basse température à des méthodes de référence : STERRAD[®] 100S, STERRAD[®] NX[™] et STERRAD[®] 100NX[™]**
- **Mesurer les éventuelles interactions avec des détergents, alcalins ou enzymatiques**

Procédés et Combinaisons testées

Méthodes de référence

- Autoclave (134°C, 18 minutes)
- Hydroxyde de Sodium (1N, 1 h, T°C ambiante) suivi de l'autoclave (134°C, 18 min)

Stérilisateurs STERRAD®

- H₂O₂ gazeux : STERRAD®100S GMP, 100S, NX™, 100NX™
- H₂O₂ liquide (59% à T°C ambiante)

Détergents

- Enzymatique, à 37°C, seul ou en combinaison avec :
 - Autoclave
 - STERRAD®
- Alcalins A et B, à 55°C et 70°C, seul ou en combinaison avec :
 - Autoclave
 - STERRAD®

Etude “STERRAD” : Différentes phases

2002 - 2005 Bio-essai

- **STERRAD® 100S / méthodes de référence**
 - Autoclave et Autoclave + NaOH
 - STERRAD® 100S cycle long (1 cycle et 2 cycles consécutifs)
 - Comb. Autoclave ou STERRAD® 100S + détergents (alc. ou enz.)

2005 - 2007 Bio-essai

- **STERRAD® NX™ vs. STERRAD® 100S**
 - STERRAD® NX™ cycle Avancé (1 cycle et 2 cycles consécutifs)
 - Combinaison STERRAD® 100S ou NX™ + détergents alcalins

2007 Tests *in vitro* sur différentes souches + matériaux

- **STERRAD® 100S, STERRAD® NX™, STERRAD® 100NX™ vs. autoclave**
 - STERRAD® 100NX™ cycles Standard et Flex
 - STERRAD® NX™ cycle Avancé

Souches de Prions utilisées

263K Souche de tremblante (*in vivo* & *in vitro*)

- Souche de tremblante adaptée au hamster
- Souche de référence pour l'évaluation de nouveaux procédés capables d'éliminer ou inactiver les prions

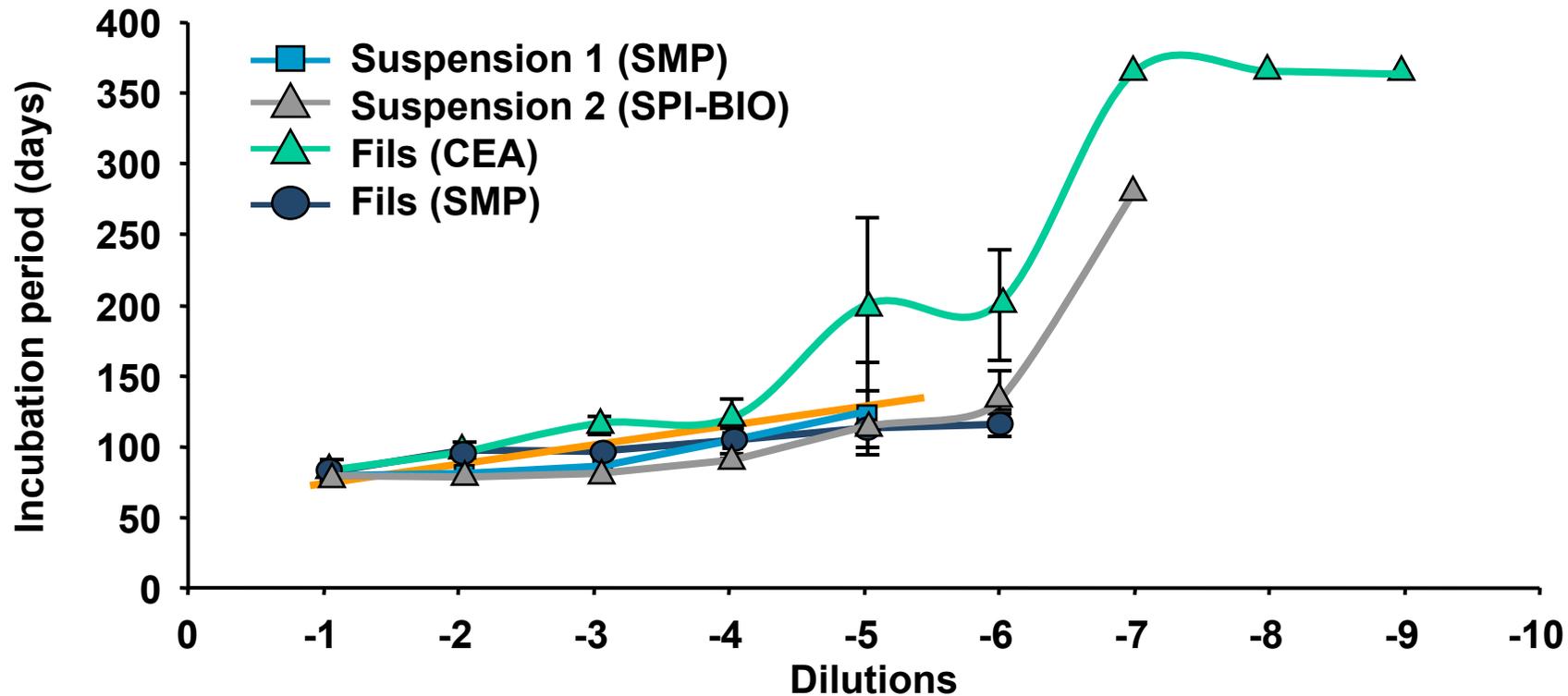
Souches "Humaines" : ESB & vMCJ (*in vitro*)

- Souche d'ESB adaptée à la souris (souche 6PB1)
- Souche de vMCJ

Bio-essai : Méthodologie

- **Fils en acier inoxydable (1.4301;** Flechsig et al., 2001)
Ø : 0,3 mm / L : 5 mm
 - Incubés dans l'homogénat de cerveau 10% (tampon phosphate) pendant 16h
 - Séchés à l'air libre à température ambiante
 - Traités par les différents procédés (sauf Témoins positifs)
 - Séchés à l'air libre à température ambiante avant implantation
- **Implantation**
 - Introduction dans une aiguille
 - Montage sur un instrument stéréotaxique
 - Fil inséré dans le cerveau d'un hamster anesthésié
- **Suivi clinique et biochimique** (Western Blot)

Bio-essai: Corrélation entre la dose infectieuse et la période d'incubation



Un retard d'incubation d'environ 12 jours correspond en moyenne à une réduction du titre infectieux de 1 log.
Au delà de 200 jours, permet de détecter une infectiosité résiduelle

Résultats 1: Groupes "Témoin"

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Témoins négatifs (fils exposés à 10% d'homogénat de cerveau sain)	0%	606 ± 118	-	-
Témoins positifs (fils exposés à 10% d'homogénat de cerveau infecté par la souche 263K)	100%	83 ± 3	-	-
Homogénat 10% de cerveau infecté par la souche 263K	100%	78 ± 2	-	-
Fils implantés seulement 5 minutes	100%	101 ± 5	18	1,5
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- **Implantation : sans impact sur la durée de vie des animaux**
- **Implantation de 5 minutes : suffisante pour transmettre la maladie**
- **Méthodes de références : résultats cohérents avec d'autres préalablement publiés (Vadrot et Barbor, 2006)**

Résultats 2: Peroxyde d'hydrogène (STERRAD® 100S vs. H₂O₂ liquide)

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
H ₂ O ₂ , 59%, T°C ambiante, 10 min	50%	443 ± 140	360	≥ 5-6
STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	100%	96 ± 4	14	1,1
STERRAD® 100S 1 cycle long	100%	99 ± 6	16	1,3
STERRAD® 100S 2 cycles long cons.	100%	104 ± 8	22	1,8
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- Solution de H₂O₂ : réduction significative de l'infectiosité
- Effet comparable (modéré) des STERRAD® 100S GMP et 100S
- STERRAD® 100S : 2 cycles consécutifs > 1 cycle
- Efficacité moindre par rapport aux méthodes de référence

Résultats 5: Détergent Alcalin Combiné avec le STERRAD® 100S

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min)	11%	446 ± 153	363	≥ 5-6
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	0%	540 ± 14	457	≥ 5-6
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 2 cycles longs cons.	0%	540 ± 30	457	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1% (55°C, 10 min)	0%	524 ± 42	441	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S 1 cycle long	0%	540 ± 13	457	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1%(55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 2 cycles longs cons.	0%	552 ± 0	469	≥ 5-6

Détergents alcalins + STERRAD® 100S, 1 ou 2 cycles longs : effets significatifs, infectiosité non détectée

Résultats 6: STERRAD® NX™

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
STERRAD® NX™ 1 cycle avancé	0%	570 ± 18	487	≥ 5-6
STERRAD® NX™ 2 cycle avancé cons.	0%	574 ± 0	491	≥ 5-6
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- STERRAD® NX™ : Infectiosité non détectée
- STERRAD® NX™ : 1 cycle avancé = 2 cycles avancé cons.

Résultats 7: STERRAD® NX™ avec Pré-treatment

	Transmission Rate (%)	Incubation Period (days)	Incub. Delay (days)	RF
STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	570 ± 18	487	≥ 5-6
1% alkaline detergent A (55°C, 10 min) + STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	559 ± 22	476	≥ 5-6
1% alkaline detergent B (55°C, 10 min) + STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	562 ± 16	479	≥ 5-6
Steam 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Steam 134°C 18min	28%	554 ± 197	474	≥ 5-6

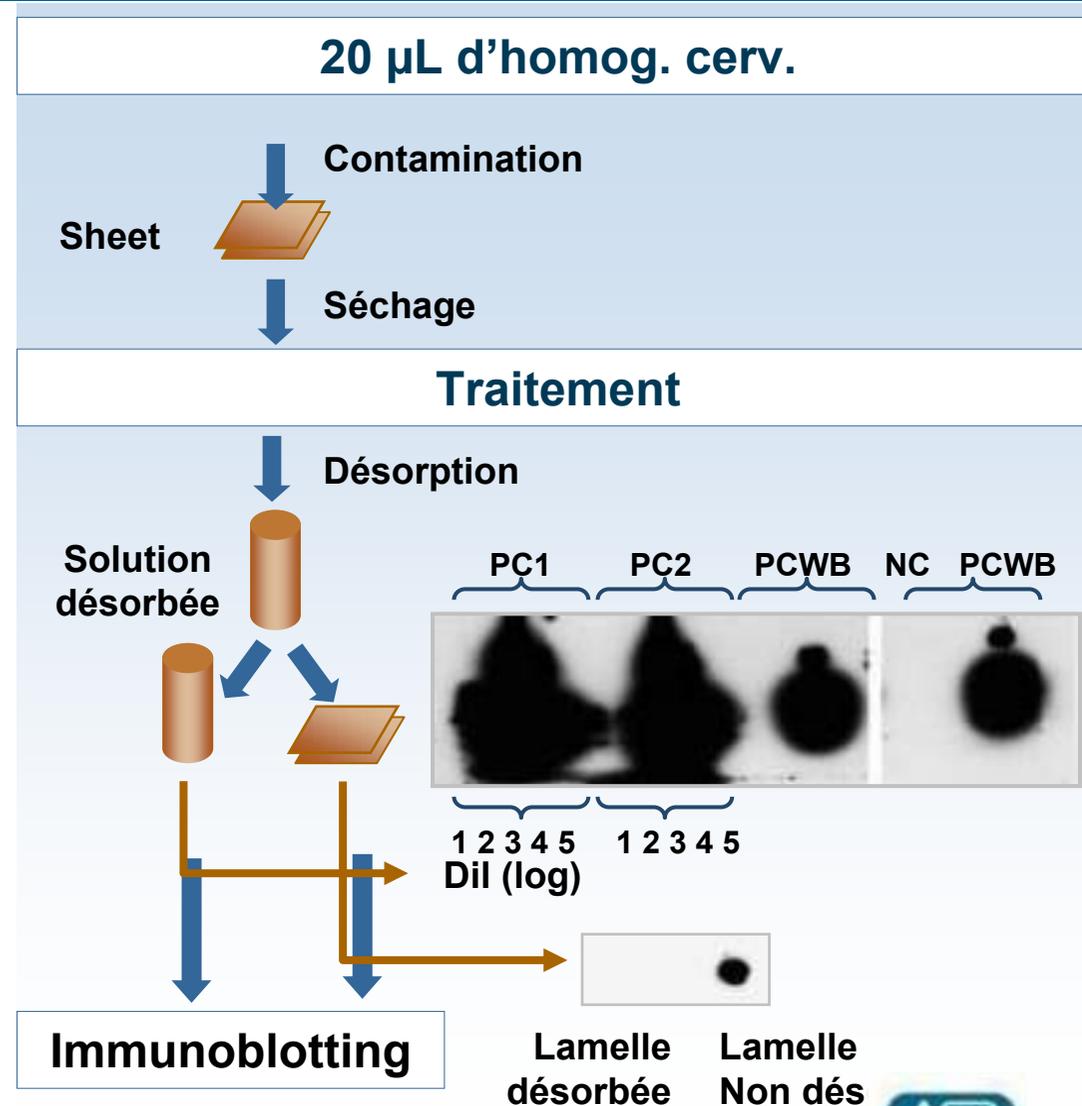
- Alkaline detergents + STERRAD® NX™ : no antagonism
- Enzymatic detergent + STERRAD® NX™ : not tested

In vitro: Méthodologie

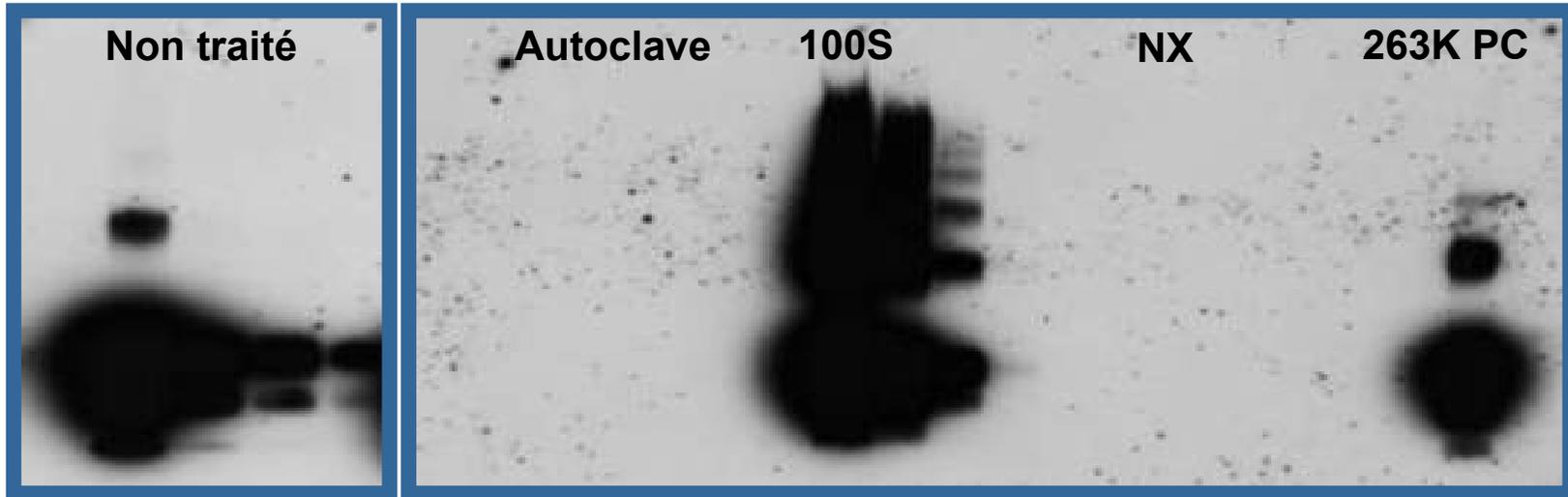
Lamelles – 9 X 9 mm

(Acier Inoxydable, Polypropylène ou Polyéthylène)

- 20 μ L d'inoculum
- Séchage à température ambiante pendant 16 heures
- Traitement par les différents procédés (sauf témoins positifs)
- Désorption (Lemmer et al., 2004)
- Détection résiduelle de la PrPres sur les lamelles
- Détermination du titre en PrPres par dilution limite dans les solutions de désorption



Résultats 8: Souche 263K STERRAD® 100S & STERRAD® NX™



Dil (log)

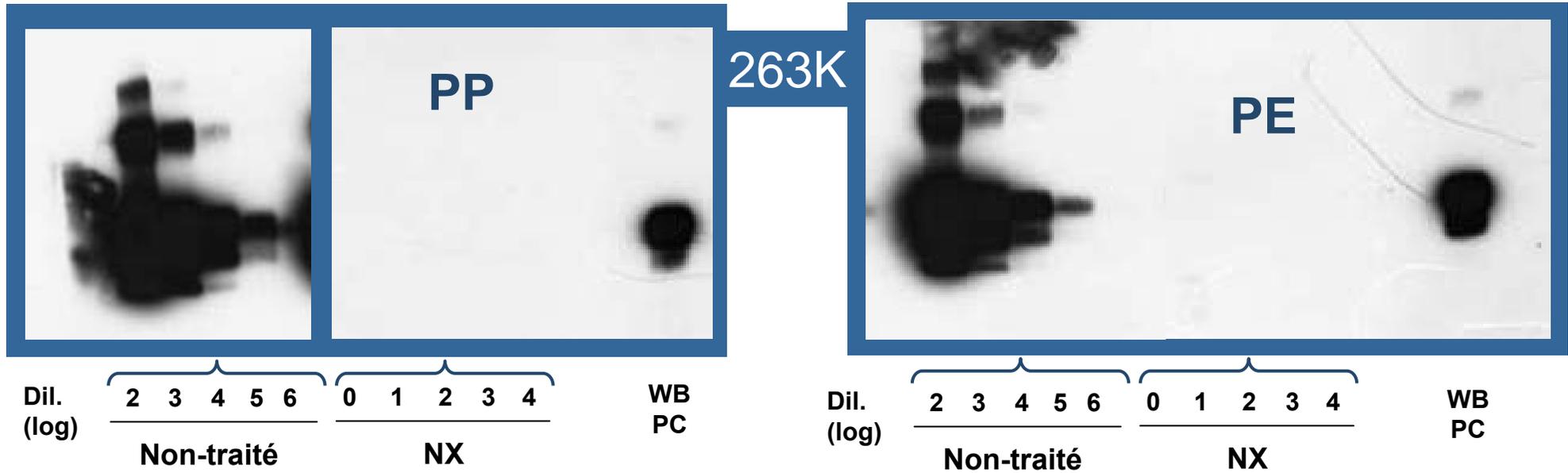
2 3 4 5
0 1 2 3 4
0 1 2 3 4
0 1 2 3 4

PC: Positive Control

Traitement	RF
Autoclave	≥ 5 log
STERRAD® 100S	2.5 log
STERRAD® NX™	≥ 5 log

- Cohérence avec les résultats *in vivo*
- STERRAD® NX™ > STERRAD® 100S

Résultats 10: Tests sur matériaux thermosensibles STERRAD® NX™



Contamination	Non-traité	NX
Polypropylene (PP)	≥ 6,5	ND
Polyethylene (PE)	≥ 6,5	ND

0 = "Neat"

ND: Non détecté

- Efficacité identique du STERRAD® NX™ sur les différents matériaux testés (acier inoxydable, polypropylène & polyéthylène)

Résultats 11: Souche 263K

STERRAD® 100NX™



Dil (log)

2 3 4 5	2 3 4 5 6	0 1 2 3 4	WB	PC
Non-traité	Standard	Flex		

Cycle	Non-traité
“Standard”	≥ 5,5
“Flex”	≥ 5,5

STERRAD® 100NX™ = STERRAD® NX™

Conclusions

STERRAD® 100S

- **STERRAD® 100S seul : 1.3 log
(1.8 log après 2 cycles consécutifs)**
- **Détergents alcalins + STERRAD® 100S : \geq 5-6 log et
taux de transmission de 0% après 1 cycle long ou 2
consécutifs**

Conclusions (Suite)

STERRAD® NX™ (seul ou associé avec un détergent alcalin)

- Infectiosité non détectée (bio-essai): $\geq 5-6$ log
- Efficacité (*in vitro*) vis-à-vis de la souche 263K & des souches « humaines »

STERRAD® 100NX™

- Efficacité identique (*in vitro*) à celle du STERRAD® NX™ vis-à-vis de la souche 263K

Conclusions (Suite)

STERRAD® NX™ (*In vitro* & *in vivo*)

- **Inactivation des prions**
- **Au moins aussi efficace que l'autoclave**

STERRAD® 100NX™ (*In vitro*)

- **Efficace vis-à-vis des prions**
- **Au moins aussi efficace que l'autoclave**