

Maisons-Alfort, le 31 mai 2002

## AVIS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

### **de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'analyse de l'article de Bosque et al. et aux données complémentaires concernant l'infectiosité des muscles**

Considérant que, suite à la publication de l'équipe de Stanley Prusiner<sup>1</sup>, des travaux complémentaires ont été initiés par le laboratoire national de référence de l'Agence à Lyon et par le Commissariat à l'énergie atomique qui ont fait l'objet d'une première note de l'Agence rendue publique le 27 mars 2002 ;

Considérant que le Comité d'experts spécialisé sur les ESST a été saisi par l'Agence le 30 avril 2002 d'une demande visant à ce que ces données soient examinées dans une double perspective :

- leur signification au regard de l'évaluation et de la maîtrise des risques,
- les suggestions qui peuvent être justifiées d'études complémentaires ;

Considérant que le comité a rendu, en date du 21 mai 2002, l'avis suivant (accompagné des annexes et tableaux) :

*« L'article du groupe de Prusiner rapporte la présence, au stade terminal de la maladie, de PrPres et d'infectiosité dans certains muscles de deux lignées différentes de souris conventionnelles inoculées par voie intracérébrale par deux souches différentes de tremblante adaptées aux rongeurs. Cette accumulation est, de manière surprenante, spécifique à certains groupes musculaires (comme ceux des membres postérieurs) à l'exclusion d'autres (comme ceux du dos, du cou, des membres antérieurs). Les titres infectieux mis en évidence sont parfois élevés, et ne sont qu'environ 500 fois plus faibles que dans le cerveau. Néanmoins le détail de la dissection du tissu musculaire n'est pas rapporté, non plus que des données d'immunohistochimie permettant de vérifier la localisation de la PrPres : il n'est donc pas possible d'exclure, sur la base des informations fournies, que des cellules lymphoïdes ou des troncs nerveux (sciatique) aient été les vecteurs de l'infectiosité. Des interrogations subsistent donc dans ce modèle sur l'analogie muscle/tissu musculaire. Cependant, l'inoculation par voie intramusculaire de souris transgéniques exprimant la PrP sous le contrôle de promoteurs muscle-spécifique montre une accumulation locale musculaire de l'infectiosité, qui ne correspond manifestement pas à un résidu d'inoculum : ceci suggère que, dans certains modèles exprimant artificiellement de hauts niveaux de PrPc dans le tissu musculaire, celui-ci soit capable, sous certaines conditions, de « répliquer » certaines souches de prions. Les résultats obtenus ne peuvent néanmoins pas être transposés directement aux bovins car on connaît des grandes différences de distribution des agents des ESST en fonction de la souche, de l'espèce hôte et de la voie d'administration. On peut ainsi souligner que ces résultats s'opposent aux données actuellement connues chez les bovins et même dans les autres espèces (voir tableau 1 et 2). Ces résultats s'opposent également aux mécanismes physiopathologiques chez les bovins, tels qu'ils sont actuellement décrits (en particulier l'absence d'implication du système lymphoïde, hors plaques de Peyer à la porte d'entrée digestive). Or, compte tenu du rôle fondamental de la trilogie « souche de prion/espèce et génétique éventuelle/voie d'administration » dans la dissémination des*

<sup>1</sup> Bosque et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3812-7

*prions dans l'organisme, le modèle homologue (ESB/bovin/voie orale) est plus pertinent que les modèles expérimentaux chez les rongeurs pour juger du risque lié aux différents tissus bovins.*

*Néanmoins, un résultat particulier rapporté pour ce modèle est une répartition de l'infectiosité extrêmement variable entre les groupes musculaires. A la lumière de ces résultats, si une infectiosité devait être détectée dans le muscle de bovins infectés, il se pourrait donc que la distribution en soit hétérogène. Or les données disponibles des bioessais chez la souris de tissus de bovins en incubation et malades (tableau 1 et 2) ne concernent qu'un nombre limité de muscles (à l'exclusion de la plupart des muscles des membres postérieurs). Ceux des bioessais effectués chez les bovins par injection intracérébrale ne concernent pour l'instant qu'un pool limité de muscles (y compris des membres postérieurs, mais avec les réserves sur la sensibilité inhérentes à l'utilisation d'un pool) prélevés sur des animaux en incubation (dont la plus longue correspond à une incubation de 32 mois) : ces résultats peuvent néanmoins être considérés comme exploitables car les receveurs ont désormais 65 mois d'incubation : ils sont toujours en bonne santé.*

*De manière à prendre en compte cette hétérogénéité potentielle, ces données ont été complétées au cours de la semaine du 18 au 25 mars 2002 par l'utilisation de tests de détection de la PrPres dans différents tissus de plusieurs catégories d'animaux, dont le rapport figure en annexe :*

- un bovin dépisté positif pour l'ESB à l'abattoir, avant sa destruction ; chez cet animal, en plus de 12 muscles différents, différents groupes ganglionnaires lymphatiques et le nerf sciatique ont été également testés,*
- différents groupes musculaires de quatre souris infectées par l'agent de l'ESB : 2 au stade pré-clinique, 2 au stade terminal,*
- différents groupes musculaires d'un mouton et une chèvre atteints de tremblante naturelle au stade clinique de la maladie, et de deux moutons infectés par l'agent de l'ESB, au stade clinique de la maladie.*

*L'ensemble de ces résultats se sont révélés négatifs. La limite de détection du test le plus sensible utilisé pour les prélèvements de muscles de bovins dans cette étude est de 2 doses infectieuses par voie intracérébrale chez la souris par gramme (Deslys et al. 2001). La limite de détection de ce test exprimée en doses infectieuses par voie orale pour l'homme peut être approchée en considérant les hypothèses qui maximisent le risque<sup>2</sup> : 1 dose infectieuse de l'ESB par voie orale chez les bovins est de l'ordre de 0,1 g de cerveau bovin, lequel titre au moins 10<sup>3</sup> doses infectieuses par gramme par voie intracérébrale chez la souris ; sur cette base 1 dose infectieuse d'ESB par voie orale chez les bovins correspond à 100 doses infectieuses par voie intracérébrale chez la souris. La limite de détection serait donc de 0,02 dose infectieuse par gramme par voie orale chez les bovins, soit environ 2 doses infectieuses par voie orale chez l'homme pour 100 g de muscle en l'absence de barrière d'espèce bovin vers homme. L'existence probable mais actuellement non quantifiable d'une barrière d'espèce bovin-homme diminuerait ce seuil de détection, et augmenterait donc le niveau de sécurité lié aux résultats négatifs. Par ailleurs, compte tenu des faibles concentrations attendues et de la quantité limitée de matériel testé par échantillon (variant, pour des raisons techniques, de*

<sup>2</sup> voir Avis du Comité du 31 décembre 2001

6 à 30 mg), les limites statistiques de l'échantillonnage peuvent permettre à de faibles niveaux de PrPres d'échapper à la détection.

En résumé, les résultats obtenus pour les muscles testés sont négatifs : on peut considérer que dans un scénario maximisant le risque, construit à partir des connaissances disponibles sur la dose infectieuse chez les bovins, et les limites des performances des tests utilisés, ce résultat négatif est compatible avec un niveau d'infectiosité dans le muscle au plus égal à 2 doses infectieuses par voie orale chez l'homme pour 100g de tissu musculaire.

Pour ces raisons méthodologiques, la limite de détection imposée par ces tests ne permet donc pas de démontrer une garantie suffisante pour le consommateur, ce qui a conduit à chercher à préciser ces résultats par la recherche d'une accumulation de PrPres dans les tissus nerveux périphériques et lymphoïdes. En effet, ces tissus accumulent de la PrPres dans plusieurs modèles d'ESST naturels ou expérimentaux pour lesquels aucune infectiosité n'a été mise en évidence dans le muscle, et peuvent être considérés comme des marqueurs plus sensibles d'une dissémination large de l'agent infectieux. Pour ce qui concerne le bovin contaminé par l'ESB, les résultats obtenus pour les ganglions lymphoïdes testés, ainsi que pour le nerf sciatique, se sont révélés négatifs (avec la même limite de détection). Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus chez les ovins et la souris infectés par l'agent de l'ESB, et le cerf et le cerf-mulet atteints de maladie du dépérissement chronique<sup>3</sup> où l'accumulation de PrPres dans les ganglions lymphoïdes est au moins 10 fois (et jusqu'à au moins 100 fois) supérieure à celle du muscle<sup>4</sup>. En appliquant le même rapport minimal de concentration entre ganglion lymphoïde et muscle que dans ces modèles où la dissémination est large au cas de l'ESB bovine, l'infectiosité dans le muscle, si elle existe, ne devrait pas être supérieure à 0,2 dose infectieuse pour 100 g. Ainsi, ces observations sont cohérentes avec les données acquises jusqu'à présent concernant la distribution de l'infectiosité ou de son marqueur PrPres chez le bovin et ne modifient pas l'évaluation sur l'absence d'infectiosité du tissu musculaire à un niveau compatible avec une contamination humaine alimentaire, même si elles n'en apportent pas une preuve formelle complète.

De plus, le Comité rappelle que tous les bovins de plus de 24 mois consommés en France font l'objet d'un test négatif sur le système nerveux central. Un risque d'exposition des consommateurs ne pourrait alors résulter que de la double hypothèse de l'infectiosité à dose suffisante du muscle et d'une accumulation de cette infectiosité précédant celle s'accumulant dans le système nerveux central.

Afin de consolider ces conclusions, le Comité recommande néanmoins que :

- une dizaine de bovins naturellement atteints d'ESB fassent l'objet d'une recherche de PrPres par des méthodes rapides dans un large échantillonnage de groupes musculaires, ganglions lymphatiques et troncs nerveux,
- ces prélèvements pourraient être utilement complétés par ceux de la rate et de différents étages de l'intestin, en particulier l'iléon,

<sup>3</sup> Chronic Wasting Disease

<sup>4</sup> C'est-à-dire que des résultats négatifs ont été enregistrés pour le muscle alors qu'une concentration 10 à 100 fois plus faible de ganglion lymphatique donnait encore un résultat positif (Deslys, communication directe).

- *en raison de la sensibilité analytique de certains tests de détection de la PrPres, tels que certains de ceux utilisés pour les prélèvements bovins dans cette étude, analogue à celle de l'inoculation intracérébrale aux souris conventionnelles, l'inoculation de ces prélèvements à la souris conventionnelle apporterait peu d'informations complémentaires,*
- *enfin, si certaines lignées de souris ovinisées ou bovinisées se révélaient plus sensibles à l'ESB que des souris conventionnelles, l'inoculation d'au moins une de ces lignées apporterait des informations utiles à l'analyse de risque, alternativement à l'option d'inoculation intracérébrale de bovins qui apparaît actuellement impossible à conduire en France ».*

Tels sont les éléments d'analyse complémentaires que l'Agence est en mesure de préciser qui n'appellent pas de recommandation nouvelle en matière de maîtrise des risques, tout en veillant à ce que soient conduites les recherches préconisées par le comité.

**Martin HIRSCH**

**TABEAU 1 : RECAPITULATIF DES DONNEES PUBLIEES SUR L'INFECTIOSITE DU MUSCLE.**

Espèce d'origine	Inoculum (échantillons)	Espèce receveuse	Voie d'inoculation	Echantillons positifs / Total des échantillons testés	Référence
Tremblante du Mouton					
Chèvre (expérimentale)	Muscle squelettique (biceps femoris : cuisse)	Chèvre	i.c.	1/12	(Pattison & Millson 1962) + commentaires (Pattison 1990)
Chèvre	Muscle squelettique (vastus lateralis : cuisse)	Souris	i.c.	0/3	(Hadlow et al. 1980)
Mouton	Muscle squelettique (non précisé)	Souris	i.c.	0/18	(Hadlow et al. 1982)
Encéphalopathie Spongiforme Bovine					
Bovin (infecté par voie orale)	Muscle squelettique (non précisé)	Souris	i.c.	0/30	(Wells et al. 1998)
Bovin	Muscle squelettique (semitendinosus- cuisse- , M. diaphragma, M. longissimus –dos- , M. masseter-tête)	Souris	i.c.	0/9	(Bradley 1999)
Maladie de Creutzfeldt-Jakob					
MCJ	Muscle squelettique (non précisé)	Primates	i.c.	0/5	Brown, 1999, Brown <i>et al.</i> , 1994
i.c. : intracérébrale ; MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob					

TABEAU 2 : RECAPITULATIF DES DONNEES NON PUBLIEES SUR L'INFECTIOSITE DU MUSCLE BOVIN

Résultats non publiés Hawkins et Wells , <b>Bioessai tissus bovins chez la souris RII</b> , C57B6 (bilan janvier 2002) <sup>5</sup>	
Muscle triceps	Neg (membre antérieur)
Muscle masseter	ND (tête)
Muscle sternocéphalique	Neg (gouttière jugulaire)
Muscle « longissimus dorsi »	Neg (extenseur de la colonne vertébrale)
Ventricule cardiaque gauche	Neg
Résultats non publiés Hawkins et Wells , <b>Bioessai tissus bovins chez les bovins</b> (bilan avril 2002) <sup>6</sup>	
Pool de muscle semitendineux (cuisse), masseter (tête) et « longissimus dorsi » (extenseur de la colonne vertébrale) prélevé 32 mois post inoculation orale ; inoculation ic aux bovins survie 65 mois (au 04/02)	

<sup>5</sup> Opinion on TSE infectivity distribution in ruminant tissues (state of knowledge, December 2001) (SSC, UE 10-11 January 2002)  
<sup>6</sup> Opinion on TSE infectivity distribution in ruminant tissues (state of knowledge, December 2001) (SSC UE adopted on 10-11 January 2002) et Statement on prions in muscle (SSc UE 04-05 April 2002)

**Bilan des analyses effectuées sur des échantillons de muscles, de nerfs et de tissus lymphoïdes d'animaux atteints de maladies à prions**

**Echantillons analysés.**

**\* Bovins**

Un bovin atteint d'ESB (détecté avec la technique Prionics) (n° de dossier AFSSA 02-0946) et un bovin contrôle, négatif à l'issue du test de dépistage rapide de l'ESB, ont été étudiés par trois laboratoires indépendants (AFSSA-Lyon, CEA-Fontenay, CEA-Saclay) pour la détection de PrPres dans les tissus musculaires et différents autres prélèvements.

Pour l'animal positif, les tissus suivants ont été examinés

- Muscles fessier, psoas, biceps fémoral, semi-membraneux, sterno-céphalique, semi-tendineux, vaste médial, poplité, droit médial, long dorsal ;
- Ganglion poplité, ganglion ischiatique, ganglion crural ;
- Nerfs du vaste médial, du droit médial, sciatique, obturateur, du semi-membraneux, plexus brachial, fessier, brachial, et nerf de la dernière lombaire.

Sur le bovin contrôle, les tissus suivants ont été étudiés:

- Muscles gastrocnémien, fessier, quadriceps fémoral, semi-tendineux, long dorsal, vaste interne, sterno-céphalique ;
- Ganglion poplité ;
- Nerfs sciatique, gastrocnémien, du vaste interne.

**\* Ovins / caprins**

Chez un mouton et une chèvre atteints de tremblante naturelle au stade clinique ont été étudiés muscles fessiers et nerf sciatique (CEA-Fontenay)

Chez deux moutons (SB1 et SB3) inoculés expérimentalement avec du cerveau de bovin atteint d'ESB et sacrifiés au stade terminal de la maladie, les tissus suivants ont été examinés :

- Muscle quadriceps fémoral,
- Myocarde, foie

**\* Ruminants sauvages**

Quinze ruminants sauvages (cerfs-mulets et élans) atteints de CWD (chronic wasting disease) ont été étudiés (muscles long dorsal, triceps, semitendineux ; rate) (CEA-Fontenay).

**\* Souris**

Chez deux souris sacrifiées au stade préclinique d'ESB expérimentale (souche de laboratoire 6PB1) après inoculation intracérébrale (J145 post-inoculation pour une maladie au stade terminal à J180) ont été étudiés muscles quadriceps, triceps sural, semi-tendineux et gastrocnémien, rate et cerveau (CEA-Fontenay).

Sur deux souris C57Bl/6 sacrifiées au stade terminal d'un second passage d'ESB, initialement réalisée à partir d'un cas d'ESB expérimentalement transmise au mouton, les organes et groupes musculaires suivants ont pu être analysés (AFSSA-Lyon) :

- Cerveau, myocarde, rein,



- *Muscles du cou, muscle des membres antérieurs, muscles pectoraux, muscles du bassin, muscles des membres postérieurs (extenseurs et fléchisseurs de la jambe).*

### **Tests réalisés**

#### \* AFSSA-Lyon :

- 1) *Western blot après concentration de la protéine prion anormale par ultracentrifugation (2 heures à 100.000 g). Les anticorps utilisés ont été chez la souris SAF 60, chez le mouton BAR 233 et chez le bovin SAF 84.*
- 2) *Test Elisa Bio-Rad (moutons, bovins) conformément aux instructions recommandées par le fournisseur (homogénat 20%).*

*L'analyse d'un échantillon par ces différentes techniques s'est faite à partir d'un même homogénat (échantillon 20 % broyé dans du glucosé 5% ou dans un tampon de lyse pour les tissus nerveux).*

*Les tissus nerveux n'étant pas convenablement homogénéisés dans l'eau glucosée, leur homogénéisation a été réalisée dans un tampon particulier. Cette préparation d'homogénats 20% fut utilisée pour la technique Bio-Rad, et diluée pour l'emploi de la technique de Western Blot.*

*Pour l'analyse par Western blot des échantillons bovins et ovins deux techniques d'extraction de la protéine prion ont été utilisées :*

- *traitement à la protéinase K à raison de 10 µg pour 100 mg de tissu (technique standard),*
- *incubation une nuit à 37 °C en présence de collagénase (0.5 mg / 100 mg de tissu) et de DNase (40 µg / 100 mg de tissu), préalable à la digestion par la protéinase K à raison de 50 µg pour 100 mg de tissu (technique collagénase DNase).*

#### \* CEA-Fontenay

- 1) *Test Elisa Bio-Rad sur homogénat 5% avec adaptation de la concentration de protéinase K (concentration 4 fois plus faible que pour un homogénat 20%)*
- 2) *Test Elisa CEA-Bio-Rad version recherche (sensibilité augmentée) sur homogénat 5% avec adaptation de la concentration de protéinase K*
- 3) *Test western blot CEA-Bio-Rad après purification similaire aux conditions précédentes.*

#### \* CEA-Saclay

- 1) *Test Elisa Bio-Rad sur homogénat 20 % ou 10 %*
- 2) *Test Elisa CEA avec de nouveaux couples d'anticorps*

### **Estimation des limites de détection de la protéine prion anormale**

*Les limites de détection de la PrPres ont été évaluées par dilution de l'homogénat de matériel cérébral du bovin positif (AFSSA-Lyon) ou de deux autres bovins positifs (CEA-Fontenay), soit dans du tissu cérébral de bovin négatif, soit dans du tissu musculaire issu du bovin négatif. Résultats*

*Chez le bovin :*

- 1) *Toutes les recherches de PrPres dans les muscles sont négatives avec les différentes techniques utilisées par les différents laboratoires (des essais en*



*immunohistochimie pour rechercher une éventuelle accumulation ponctuelle de PrPres se sont également révélés négatifs au CEA-Fontenay);*

- 2) *Les recherches de PrPres dans les ganglions lymphatiques sont négatives ;*
- 3) *Les recherches de PrPres dans les nerfs périphériques testés sont négatives ;*
- 4) *Les dilutions de matériel cérébral positif indique des seuils de sensibilité allant du 1/128<sup>ème</sup> jusqu'au 1/10000<sup>ème</sup> selon les conditions expérimentales et les témoins positifs utilisés.*

*Chez les ovins infectés expérimentalement par l'ESB il n'y a pas de PrPres dans les tissus musculaires étudiés (AFSSA-Lyon).*

*Chez le mouton et la chèvre atteints de tremblante il n'y a pas de PrPres détectable dans les prélèvements de muscle de la patte postérieure ni dans le nerf sciatique (mouton) alors que les dilutions de cerveaux étaient positives au 1/1000<sup>ème</sup> et que la rate de ces animaux était positive à la dilution 1/10<sup>ème</sup> (CEA-Fontenay)*

*Chez les ruminants sauvages atteints de CWD, il n'y a pas de PrPres détectable dans les prélèvements musculaires alors qu'un fort signal est retrouvé au niveau des tissus lymphoïdes (résultats non montrés) (CEA Fontenay).*

*Ches les souris infectées expérimentalement par l'ESB (souche de laboratoire 6PB1 et passage secondaire d'ESB ovine) il n'y a pas de PrPres détectable au niveau des différents muscles étudiés alors que la rate est encore positive après une dilution au 1/50<sup>ème</sup> (résultats western blot non montrés) (AFSSA-Lyon et CEA Fontenay).*

## **Conclusions**

*La recherche de PrPres dans l'ensemble des tissus musculaires testés s'est révélée négative quelle que soit l'espèce animale et la souche de prion considérées et ce indépendamment de la technique utilisée et du laboratoire.*

*L'examen des gammes de dilutions de cerveau de bovin positif indique que les dilutions effectuées dans du muscle donnent des résultats du même ordre que celles effectuées dans du cerveau et que la sensibilité du test correspond à celle précédemment publiée c'est-à-dire de l'ordre de 2 DL50 souris i.c./g pour une transmission de l'ESB à la souris à partir d'un bovin (les versions améliorées permettent de gagner un facteur 2 à 3 en sensibilité tandis que le fait de travailler sur des homogénats à 10 ou 5% au lieu de 20%, en raison des contraintes liées aux tissus fibreux, fait chuter cette sensibilité d'un facteur 2 à 4).*

*Par ailleurs la recherche de PrPres s'est révélée négative dans les ganglions lymphatiques bovins alors qu'elle était positive dans les tissus lymphatiques ovins, caprins et murins ainsi que dans ceux des ruminants sauvages. Dans ces derniers cas un signal positif était maintenu après une dilution au 1/10<sup>ème</sup> voire au 1/100<sup>ème</sup> (résultats CEA-Fontenay non montrés) ce qui indique qu'entre les tissus lymphoïdes connus pour permettre la multiplication des souches de prions et les tissus classés sans infectiosité détectable par l'OMS, il existe un différentiel d'infectiosité potentielle au minimum du même ordre.*

*Ces résultats négatifs, au regard de la limite de détection, indiquent que l'infectiosité maximale de 100 g de muscle est inférieure à 200 DL50 dans le modèle de souris contaminée par voie intra-cérébrale, soit inférieure à 2 DL50 pour un bovin contaminé par voie orale. Le fait qu'aucun signal ne soit détectable dans les ganglions lymphatiques indique que ce seuil devrait être abaissé, concernant le muscle, d'au moins un facteur 10 à 100 soit 0,2 à 0,02 DL50 pour 100 g de muscle pour un bovin contaminé par voie orale. La barrière d'espèce qui existe entre le bovin et l'homme assure un facteur de protection supplémentaire qui n'est pas connu pour le moment.*

*Au total, les mesures effectuées n'indiquent pas de danger lié au muscle contrairement au tissu nerveux qui peut être très infectieux et potentiellement aux tissus lymphoïdes comme cela est observé chez les petits ruminants. Ces résultats sont en accord et confirment ceux qui ont présidé aux mesures de précaution prises actuellement.*

*JP Deslys, T. Baron, J. Grassi*

### Références

- BRADLEY,R. (1999) BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev.Biol.Stand.*, **99**, pp. 35-40.
- DESLYS,J.P., COMOY,E., HAWKINS,S., SIMON,S., SCHIMMEL,H., WELLS,G., GRASSI,J. & MOYNAGH,J. (2001) Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, **409**, pp. 476-478.
- HADLOW,W.J., KENNEDY,R.C. & RACE,R.E. (1982) Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J.Infect.Dis.*, **146**, pp. 657-664.
- HADLOW,W.J., KENNEDY,R.C., RACE,R.E. & EKLUND,C.M. (1980) Virologic and Neurohistologic Findings in Dairy Goats Affected with Natural Scrapie. *Veterinary Pathology*, **17**, pp. 187-199.
- PATTISON,I. (1990) Scrapie agent in muscle. *Vet.Rec.*, **126**, pp. 68.
- PATTISON,I.H. & MILLSON,G.C. (1962) Distribution of the scrapie agent in the tissue of experimentally inoculated goats. *Journal of Comparative Pathology*, **72**, pp. 233-244.
- TAYLOR,D.M., FERNIE,K., STEELE,P.J. & SOMERVILLE,R.A. (2001) Relative efficiency of transmitting bovine spongiform encephalopathy to RIII mice by the oral route. *The Veterinary Record*, **148**, pp. 345-346.
- WELLS,G.A., HAWKINS,S.A., GREEN,R.B., AUSTIN,A.R., DEXTER,I., SPENCER,Y.I., CHAPLIN,M.J., STACK,M.J. & DAWSON,M. (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet.Rec.*, **142**, pp. 103-106.