

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 7 juli 2006
KENMERK CGM/060707-01
ONDERWERP Advies handelingen met *Plasmodium falciparum* in een ruimte zonder inperking
(IG 97-018/03)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek van de Stichting Katholieke Radboud Universiteit Nijmegen om werkzaamheden met genetische gemodificeerde *Plasmodium falciparum* te mogen uitvoeren buiten een ingeperkte ruimte, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde parasiet *Plasmodium falciparum*: de belangrijkste veroorzaker van malaria. De parasiet kan zich zowel seksueel als aseksueel vermeerderen. De werkzaamheden betreffen het sorteren van de seksuele stadia van de parasiet met behulp van een zogenaamd 'FACS-apparaat'. Deze apparatuur bevindt zich in een ruimte waaraan geen inperkingsniveau is toegekend.

De seksuele stadia van de parasiet zijn in tegenstelling tot de aseksuele stadia niet infectieus voor de mens. Om de aseksuele stadia af te doden, wordt de parasietenkweek behandeld met het middel N-acetyl glucosamine. De COGEM is van mening dat deze behandeling het overgrote deel van de aseksuele stadia zal doden maar kan de aanwezigheid van enkele infectieuze parasieten niet uitsluiten.

Indien er infectieuze parasieten aanwezig zijn, kan de mens alleen besmet worden indien er een snij- of prikaccident optreedt. Dit aangezien de mug die verantwoordelijk is voor de verspreiding van de parasiet, niet in Nederland voorkomt. De COGEM is van mening dat indien zich een snij- of prikincident heeft voorgedaan de medewerker behandelend moet worden met een voor de gebruikte parasietenstam effectieve profylaxe.

De COGEM is van mening dat bij uitvoering van bovenstaande experimenten, met inachtneming van de gestelde maatregelen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small dash.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. R.C. Zwart

Werkzaamheden met *Plasmodium falciparum* in een ruimte buiten inperking

COGEM advies CGM/060707-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO betreffende werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde parasiet *Plasmodium falciparum*. Deze parasiet is de belangrijkste veroorzaker van malaria. De aanvrager beschikt reeds over een vergunning om werkzaamheden met de parasiet te mogen uitvoeren op ML-II niveau. De aanvrager heeft het voornemen experimenten uit te voeren waarbij een “Fluorescent Activated Cell Sorter” (FACS) wordt gebruikt. Deze FACS staat in een ruimte waaraan geen inperkingsniveau is toegekend. De COGEM is gevraagd over deze specifieke handelingen te adviseren. Bij de nu volgende risicoanalyse zullen de ziekte malaria, de rol van *P. falciparum* hierin en de werkzaamheden tijdens het FACS-experiment in overweging worden genomen.

Malaria, mug en parasiet

P. falciparum behoort tot het geslacht *Plasmodium* en de familie Plasmodiidae. Naast de *Plasmodium* soorten die knaagdieren, hagedissen, apen en gevogelte kunnen infecteren zijn er vier soorten *Plasmodium* geïdentificeerd die infectieus zijn voor mensen; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* en *P. malariae*. Recentelijk werd melding gemaakt van een eventuele vijfde parasiet die malaria bij de mens kan veroorzaken, te weten *P. knowlseyi*. Getwijfeld wordt echter of het hier een nieuwe soort dan wel een variant van *P. malariae* betreft (1).

Verschillende *Plasmodium* parasieten zijn de veroorzaker van malaria bij zowel mensen als dieren. Er komen drie vormen van malaria voor bij de mens; malaria tropica, malaria tertiana en malaria quartana. Malaria tropica is de meest voorkomende en de meest dodelijke vorm. Deze vorm van malaria wordt veroorzaakt door de parasiet *P. falciparum* waarmee in deze aanvraag experimenten worden uitgevoerd.

De parasiet wordt op mensen overgedragen door muggen behorend tot het geslacht *Anopheles*. Vrouwelijke muggen van dit geslacht hebben bloed nodig voor de ontwikkeling van de eieren die ze bij zich dragen. De mannelijke muggen steken niet en voeden zich met nectar (2).

De *Anopheles* mug is actief tussen zonsondergang en zonsopgang. Er is geen overdracht van malariaparasieten bij temperaturen onder de 16°C of boven de 33° C. Normaliter vindt er geen directe overdracht plaats van mens op mens. Malaria kan in sommige gevallen worden overgedragen door bloedtransfusie met het bloed van een malariapatiënt, van moeder op kind, en via hergebruik van besmette naalden. In Nederland is één geval beschreven van een verpleegkundige die na een prikaccident malaria kreeg (3). Buiten het lichaam in menselijk bloed overleeft de parasiet zeer kort (korter dan één uur) (3).

De meeste *Anopheles* soorten zijn niet in staat *Plasmodium* parasieten over te dragen en slechts een beperkt aantal combinaties *Plasmodium* en *Anopheles* kunnen malaria veroorzaken (4). In Afrika is de soort *A. gambiae* de belangrijkste vector van de parasiet *P. falciparum*. Echter ook andere soorten zoals *A. arabiensis*, *A. funestus* en *A. merus* kunnen de parasiet overbrengen.

In Nederland kwam malaria tot na de Tweede Wereldoorlog voor in de kustprovincies. Het laatste geval van autochtone malaria stamt uit 1959. In 1970 is Nederland door de 'World Health Organisation' (WHO) malariavrij verklaard (5). Momenteel komt er in Nederland één *Anopheles* mug voor die als vector kan dienen voor de malariaparasiet *P. vivax*. De parasiet *P. falciparum* heeft in Nederland geen natuurlijke vector (6, 7).

Voor de bestrijding van malaria is geen vaccin aanwezig. Bescherming tegen de ziekte wordt verkregen door steken van de *Anopheles* mug te voorkomen. Dit kan geschieden door middel van een insecticide-geïmpregneerde klamboe, beschermende kleding of insecten-spray. Door het nemen van profylactische middelen zoals Lariam® en Malarone® kan ook bescherming verkregen worden (8). Indien een patiënt geen profylaxe genomen heeft en toch ziek wordt zijn er verschillende geneesmiddelen voorradig die voor behandeling gebruikt kunnen worden (3,9).

De levenscyclus van de parasiet

Het eerste deel van de levenscyclus brengt *P. falciparum* door in de mens. In de mug wordt zijn levenscyclus gecompliceerd.

In de mens

Bij een beet van een geïnfecteerde mug injecteert de mug de parasiet, in de vorm van zogenaamde sporozoïeten, in de bloedbaan van de mens. Direct daarna verplaatsen de sporozoïeten zich naar de lever, dringen de levercellen binnen en ontwikkelen zich daar tot merozoïeten. Deze metamorfose duurt circa vijf tot zes dagen. De merozoïeten maken zich vervolgens vrij uit de lever en dringen rode bloedcellen binnen. Hier ontwikkelt de merozoïet zich tot trofozoïet en vervolgens tot bloedschizont waaruit zich opnieuw merozoïeten ontwikkelen. Deze vermenigvuldiging is aseksueel. Na ongeveer 48 uur

barsten de bloedcellen open waarna de vrijgekomen merozoïeten nieuwe bloedcellen infecteren. Tijdens de periode dat de parasiet zich in de lever bevindt vertoont de mens geen ziekteverschijnselen. Deze treden pas op bij het openbarsten van de bloedcellen en bij het vrijkomen van door de parasiet geproduceerde toxines in de bloedbaan.

Enkele merozoïeten vormen mannelijke of vrouwelijke gametocyten. Wanneer een vrouwelijke mug vervolgens bloed opneemt van een met malaria besmet persoon neemt zij de gametocyten op (10).

In de mug

De gametocyten komen samen met het bloed in het maagdarmsstelsel van de mug terecht. In de middendarm aangekomen veranderen de gametocyten in gameten. De mannelijke gameten versmelten met vrouwelijke gameten waardoor zygoten ontstaan. Om uiteindelijk weer als sporozoïet met het speeksel mee overgedragen te worden naar de mens moet de zygoot in de mug nog een aantal veranderingen ondergaan en twee membranen passeren. Slechts een beperkt aantal sporozoïeten blijkt hiertoe in staat en komt uiteindelijk in de speekselklieren terecht (11,12). Hierna kan de mug via het speeksel mensen infecteren met de parasiet en is de cyclus rond. Het gehele ontwikkelingsproces van gametocyt tot sporozoïet duurt minimaal een week en is temperatuurafhankelijk.

De werkzaamheden tijdens het FACS-experiment

Zoals hierboven beschreven worden op een zeker moment in de levenscyclus van de mug gametocyten gevormd. Dit kunnen mannelijke (micro) of vrouwelijke (macro) gametocyten zijn. De aanvrager wil deze gametocyten van elkaar scheiden door gebruik te maken van een FACS. De gametocyten produceren een fluorescerend 'GFP-' of 'DsRed-eiwit'. De FACS kan op basis van deze fluorescentie de gametocyten van elkaar scheiden.

De FACS-apparatuur bevindt zich in een niet-geclassificeerde ruimte. Alvorens de gametocyten worden gesorteerd, worden ze twee weken gekweekt en de laatste zeven dagen daarvan zal N-acetyl glucosamine worden toegevoegd. Hierdoor worden volgens de aanvrager alle aseksuele parasieten die infectieus zijn voor de mens, afgedood.

De aanvrager heeft voor het experiment verschillende aanvullende voorschriften opgesteld.

- Het vervoer van de gametocyten naar de FACS-ruimte vindt plaats in voor ggo goedgekeurde containers met daarop het opschrift 'ggo's voor FACS sort'.
- Het openen van de buizen, waarin zich de bloedmonsters bevinden, bij de FACS-apparatuur zal tot een minimum worden beperkt.

- De FACS bevat geen scherpe naalden waarmee prikaccidenten in principe kunnen worden voorkomen.
- Tijdens de metingen blijft de buis achter een gesloten deurtje en eventueel gevormde aerosolen worden afgezogen en door een Hepafilter geleid.
- Het afval wordt opgevangen in een afvalvat waaraan twee chloortabletten ter desinfectie zijn toegevoegd.
- Het afvalvat wordt de volgende ochtend of na minimaal twee uur incubatie gelegeed.
- Na afloop van het experiment wordt de FACS doorgespoeld met een 0,1% chlooroplossing en worden de tafels waarop de FACS zich bevindt schoongemaakt met 70% alcohol.
- Overgebleven gametocyten die niet gescheiden zijn, worden naar het ML-II laboratorium vervoerd en daar volgens de geldende voorschriften afgevoerd.
- Het filter dat in de FACS aanwezig is wordt maandelijks vervangen en verpakt in een plastic zak via het te autoclaveren afval afgevoerd.

Overweging en advies

In het experiment wordt gewerkt met de seksuele stadia (gametocyten) van *P. falciparum* die niet infectieus zijn voor de mens. De ontwikkeling van een gametocyt tot een infectieuze sporozöiet vindt, zoals hierboven beschreven, plaats in de mug. Besmetting van de mens met gametocyten zal dus niet leiden tot malaria. Besmetting met aseksuele stadia van de parasiet kan wel leiden tot het ontstaan van malaria. Het is daarom van belang dat uitgesloten kan worden dat er tijdens de experimenten aseksuele stadia van *P. falciparum* aanwezig zijn.

Om dit te bereiken worden de gametocyten gedurende twee weken gekweekt waarvan de laatste week onder invloed van 50 mM N-acetyl glucosamine. Uit de literatuur blijkt dat na de behandeling geen aseksuele stadia van de parasiet microscopisch detecteerbaar zijn (13). Deze negatieve screening neemt naar de mening van de COGEM niet weg dat nog steeds een (zeer) lage parasitemie mogelijk is.

Besmetting naar de medewerker dient in dit geval dus voorkomen te worden. De aseksuele stadia van *P. falciparum* kunnen door verschillende *Anopheles* muggen worden overgedragen aan de mens. In Nederland komt er van nature geen *Anopheles* mug voor die *P. falciparum* kan overdragen. Overdracht op het laboratorium kan daarom alleen plaatsvinden bij snij- of prikaccidenten. De FACS-apparatuur bevat echter geen scherpe naalden of onderdelen zodat de kans op besmetting via deze weg zeer klein is. Indien zich toch een snij- of prikaccident heeft voorgedaan, acht de COGEM het noodzakelijk dat uit voorzorg profylaxe moet worden toegediend. De geschiedenis heeft uitgewezen dat steeds meer *P. falciparum* stammen resistent worden tegen bestaande middelen. De

COGEM is daarom van mening dat het noodzakelijk is dat tijdens de experimenten een gevoelige stam gebruikt wordt. De aanvrager geeft aan dat de gebruikte stam *P. falciparum* bewezen gevoelig is voor verschillende middelen maar meldt niet welke stam dit is. De COGEM heeft vernomen dat de aanvrager reeds onderzoek uitvoert waarbij vrijwilligers worden besmet met een gevoelige *P. falciparum* stam en is er bij deze beoordeling van uitgegaan dat ook in onderhavig experiment een gevoelige stam wordt gebruikt.

Een zeer gering risico zou kunnen ontstaan wanneer het materiaal met daarin de gametocyten (en in het zeer onwaarschijnlijke geval de aseksuele stadia) na afloop van het experiment niet afdoende wordt afgedood en waarna via een snij- of prikincident een persoon geïnfecteerd raakt. De aanvrager heeft daarom aanvullende maatregelen voorgesteld die tijdens en na het FACS-experiment in acht moeten worden genomen. De COGEM is van mening dat de voorgestelde maatregelen afdoende zijn om de verschillende stadia van de parasiet te inactiveren.

Concluderend is de COGEM van mening dat met door de aanvrager voorgestelde maatregelen, de condities waaronder het experiment wordt uitgevoerd en de inschaling die door Bureau GGO is opgesteld, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de FACS-experimenten verwaarloosbaar klein zijn. Hierbij merkt de COGEM op dat zij het noodzakelijk acht dat in geval van snij- of prikincidenten effectieve profylaxe aan de medewerker wordt toegediend.

Referenties

1. Singh B. Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ, 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The lancet* **363**: 1017-1024.
2. Wikipedia (2006). Muggen. Internet: <http://nl.wikipedia.org/wiki/Muggen> (3 juli 2006)
3. Landelijke Coördinatiestructuur infectieziektenbestijding (2004). Protocol infectieziekten malaria B50-54
4. Shahabuddin M, Costero A, 2001. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**: 231-240.
5. Kaaden J.J., (2003). Geschiedenis van de inheemse malaria in Nederland. *Infectieziekten Bulletin* **14**: 388-393
6. Takken W., Geene R., Adam W., Jetten T.H., Van der Velden J.A. (2002). Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers rhine and meuse, the Netherlands. *BioOne* **21**

7. De Zulueta J., Ramsdale C.D. en Coluzzi M. (1975). Receptivity to malaria in Europe. *Bulletin of the World Health Organisation* **52**: 109-111
8. Van Gool T., Sauerwein R., Schallig H., verhave J.P., (2006). *Plasmodium falciparum*. Nederlandse vereniging voor parasitologie. Internet (26 juni 2006)
http://www.medischeparasitologie.nl/parasieten/iplasmodium_falciparumibr_.html
9. College voor zorgverzekeringen. Farmacotherapeutisch Kompas, malariamiddelen. Internet:
<http://www.cvzkompassen.nl/fk/default.asp?soort=inleidendetekst&naam=inl%20malariamid delen> (26 juni 2006)
10. Leids Universitair Medisch Centrum (2005). Background information about Malaria. Internet: <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/back.html#cycle> (5 juli 2006)
11. Ghosh AK, Ribolla EM, Jacob-Lorena M, 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proceedings of the National Academy of Science* **98**: 13278-13281
12. Ghosh A, Srinivasan P, Abraham EG, Fujioka H, Jacobs-Lorena M, 2003. Molecular strategies to study *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends in Parasitology* **19**: 94-101.
13. Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Meis J.F.G.M. en Meuwissen J.H.E.Th. (1986). Synchronisation of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated suspension culture system. *Parasitology* **93**: 563-274