

Advies betreffende: **Transfectie van de knaagdier malaria *Plasmodium berghei***

Kennisgever: **Stichting Biomedical Primate Research Centre**

COGEM kenmerk
CGM/010305-01

BGGO nummer
GGO 96-256/1

Datum advies
5 maart 2001

Doel

De aanvrager mag op grond van beschikking DGM/SVS GGO 96-256 experimenten uitvoeren waarbij *Plasmodium berghei* getransfecteerd met vector constructen wordt gebruikt om ratten en muizen te infecteren om vervolgens fenotypes te bestuderen. De vectorconstructen bevatten diverse malaria antigeen genen, DHFTR/TS en de 5' en 3' flankerende, regulerende sequenties van deze genen als donorsequenties. De kennisgever verzoekt om een wijziging van de betreffende beschikking. Hierbij wordt verzocht om naast de eerder aangemelde handelingen, 1) met *P. berghei* besmet bloed en 2) met genetisch gemodificeerde micro-organismen in associatie met ratten en muizen, eveneens de muggenstadia van de parasiet te kunnen gaan gebruiken.

Levenscyclus van *Plasmodium spp.*

De levenscyclus van alle *Plasmodium* soorten is in grote lijnen gelijk. Als de mug bloed zuigt bij mens of dier, wordt tegelijkertijd speeksel van de mug geïnjecteerd om bloedstolling te voorkomen. Infectie van mens of dier ontstaat wanneer de mug tijdens dit proces sporozoïten (*Plasmodium* sporen) vanuit haar speekselklier in de bloedbaan injecteert. De sporozoïten bereiken via de bloedbaan de lever waar zij hepatocyten penetreren en zich gedurende een aantal dagen aseksueel vermenigvuldigen (exo-erythrocytisch stadium). Daarop komen zij vrij als merozoïten; de merozoïten penetreren rode bloedcellen in de bloedbaan waarbij nog meer merozoïten, en micro- en macrogametocyten ontstaan (erythrocytisch stadium). Dit zijn de seksuele stadia van de malaria parasiet, en de voorstadia van de gameten. Na opzuigen door een volgende mug worden in de middendarm uit de gametocyten gameten gevormd, en vindt versmelting van macrogameten met microgameten plaats. Hierbij ontstaat een ookineet die de celwand in het maagdarmkanaal van de mug penetreert, waar hij zich ontwikkelt tot oocyst. Uit deze oocyst ontstaan vele sporozoïten die naar de speekselklier migreren, waarna de cyclus opnieuw kan starten.

Het experiment

Handelingen met de muggen

Anopheles muggen worden gevoed op geïnfecteerde muizen. Tijdens de voedingen

zitten de muggen in kooitjes van muggengaas. Het kooitje wordt in een zak van muggengaas geplaatst en vervolgens in een afgesloten polystyreen doos vervoert naar het dierverblijf. Knaagdieren worden onder narcose op de muggenkooi gelegd om de muggen gedurende 10 minuten te laten voeden. De muggen steken door het muggengaas heen. Daarna worden de knaagdieren teruggelegd in hun eigen kooien. Bij het hanteren van de muggen worden vooraf en achteraf alle muggen geteld, zodat bekend is met hoeveel muggen is gewerkt en er geen muggen ongemerkt kunnen ontsnappen. Ontsnapte muggen worden opgespoord en gedood alvorens de ruimte wordt verlaten. Voor het hanteren van de muggen worden ze verdoofd met CO₂ gas, waarna maag en speekselklieren worden verwijderd. Niet gebruikte muggen worden gedood door ze in te vriezen in een plastic zak welke met CO₂ gas is gevuld. Sporozoïten uit de maag of de speekselklieren van de muggen worden gebruikt om nieuwe muizen te infecteren, of om in vitro primaire hepatocyt cultures van knaagdieren te infecteren. Bloed kan bij de muizen worden afgenomen middels een hartpunctie. De vacutainer bloedbuis wordt in een gesloten breukvrije doos vervoerd.

Klonering in Plasmodium berghei

Diverse malaria antigenen van *P. falciparum* en *P. vivax* worden gekloneerd in *P. berghei*. Er bestaat een duidelijke specificiteit tussen *Plasmodium* soorten en de *Anopheles* mug (vectorspecificiteit), en tussen *Plasmodium* soorten en het gastheer-dier (gastheerspecificiteit). Zowel *P. falciparum* als *P. vivax* zijn infectieus voor de mens in tegenstelling tot *P. berghei* wat infectieus is voor knaagdieren. Bij een dergelijk experiment dient overwogen te worden of er een reële mogelijkheid bestaat op een verandering van de gastheerspecificiteit van in dit geval *P. berghei*.

Inschaling en motivatie

Van de 380 *Anopheles* soorten zijn er circa 60 in staat malaria over te brengen. In Nederland komen van nature vijf anopheline soorten voor. Slechts één daarvan, *Anopheles atroparvus*, is in staat om *Plasmodium* soorten over te dragen die bij de mens malaria veroorzaken. De larve van deze mug komt alleen voor in brak water.

Klonering in Plasmodium berghei en handelingen met door P. berghei besmet bloed

De plasmodium soort die het meest wordt gebruikt in dieronderzoek, *P. berghei*, is uitsluitend in staat knaagdieren (boomratten, ratten, muizen, hamsters) te infecteren. *P. berghei*, kan worden overgedragen door *A. atroparvus*. Voor de ontwikkeling van *P. berghei* in *A. atroparvus* is gedurende een langere periode een zeer constante temperatuur noodzakelijk. De Nederlandse klimatologische omstandigheden zijn echter van dien aard dat *A. atroparvus* als een 'slechte' vector fungeert. Voor de ontwikkeling van de sporozoïten in *A. atroparvus* is namelijk gedurende 12-20 dagen een aaneengesloten periode met een temperatuur van 21 °C noodzakelijk. Opgemerkt dient te worden dat *A. atroparvus* niet instaat is de gevaarlijke humane parasiet *P. falciparum*

over te brengen.

Bovenstaande is aanleiding voor de aanvrager te verzoeken tot een inschaling op VMT niveau inzake de handelingen met door *P. berghei* besmet bloed en in vitro infectie van primaire hepatocyt cultures van knaagdieren. Dit verzoek is tijdens de vergadering van 8 februari 2001 overwogen, waarbij de volgende aspecten werden belicht.

P. falciparum en *P. vivax* kunnen bij de mens malaria veroorzaken. Daarbij veroorzaakt *P. falciparum* bijna alle malaria-gerelateerde humane doden. Bij genetisch gemodificeerde stammen van *Plasmodium* geldt dat de gastheerspecificiteit kan worden veranderd door uitwisseling van genen tussen verschillende *Plasmodium* soorten. Over het algemeen wordt aangegeven dat de kans op dergelijke veranderingen gering zal zijn, doordat er een groot aantal genen betrokken is bij de bepaling van de specificiteit voor gastheer en vector. Dat gegeven is echter onvoldoende basis om te concluderen dat uitwisseling van genen tussen verschillende *Plasmodium* soorten geen effect zal hebben op de gastheerspecificiteit. Hiervoor is een onderbouwing nodig waarin wordt ingegaan op de rol van de verschillende genen bij de bepaling van de gastheerspecificiteit, en de modificatie die minimaal nodig is om die specificiteit te veranderen. Deze gegevens ontbreken in de aanvraag.

De COGEM adviseert de inschaling van, zowel handelingen met besmet bloed als in vitro infectie van hepatocyten, op C-I niveau te handhaven (4.1.1.3. Bijlage 4 Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM (juni 1998)).

Handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met proefdieren

Infectie van de gevoelige gastheer, mens of dier, vindt onder natuurlijke omstandigheden alleen plaats door overdracht van sporozoïten, die worden gevormd in de mug. Deze kan *Plasmodium* opnemen door het bloed van een geïnfecteerde gastheer op te zuigen. De in Nederland voorkomende *Anopheles atroparvus* is in staat om onder andere *P. vivax* maar niet *P. falciparum* over te dragen, die bij de mens malaria veroorzaken. Muggen kunnen in een experimentele setting *Plasmodium* opnemen via een voedingsstelsel, waarin bloed met (gekweekte) gametocyten wordt aangeboden via een verwarmde membraan. Er is geen andere weg waarlangs de vector *Plasmodium spp.* op kan nemen; in vitro gekweekte stadia van *Plasmodium* kunnen bijvoorbeeld niet direct door de vector worden 'opgezogen'.

Ontsnapte, met malaria besmette muggen, kunnen, blijkens de sporadisch geconstateerde gevallen van 'airport malaria' de parasiet overbrengen. In instellingen waar wordt gewerkt met humane *Plasmodium* soorten en anopheline muggen, moet met dit gegeven rekening worden gehouden, en moeten adequate maatregelen worden genomen.

De bloedstadia die bij mens of dier voorkomen zijn besmettelijk voor de mens of het betreffende dier, ook als zij langs kunstmatige weg worden verspreid. Besmetting kan plaatsvinden door directe overdracht, bij de mens door transfusie van bloed(producten), of in het laboratorium door prik- of snijaccidenten, bij dieren door experimentele overdracht (injectie).

De COGEM is van mening dat het risico van overdracht van genetisch gemodificeerde *P. berghei* niet voldoende beperkt kan worden wanneer de geïnfecteerde dieren gehuisvest worden in een D-I verblijf. Hoewel er sprake is van een biologische inperking, is de COGEM van mening dat een D-I verblijf een te lage additionele inperking geeft, en er geen adequate voorzorgsmaatregelen genomen kunnen worden. Om deze reden adviseert de COGEM een inschaling op D-II niveau te handhaven (4.1.4.2. Bijlage 4 Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM (juni 1998)).

Bij de handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met zowel de mug als het knaagdier, acht de COGEM de onderstaande aanvullende voorschriften van belang.

Muggen zijn gehuisvest in kooien voorzien van muggengaas
Muggenkooien worden in een zak van muggengaas geplaatst en in zijn geheel in een polystyreen doos naar het dierverblijf vervoerd.
In het D-II verblijf worden de muggenkooien niet geopend.

Handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met muggen: huisvesting en dissectie

Volgens de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM (juni 1998)) dienen handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met muggen plaats te vinden in een D-II verblijf. De COGEM stemt in met het uitvoeren van deze handelingen in een C-I muggenlaboratorium waarbij de volgende voorzieningen zijn getroffen:

Het laboratorium wordt voorafgegaan door een sluis
De toegang van de sluis is afgesloten met een deur welke voorzien is van dubbele vitrage aan de binnenkant van de deur
De toegang tot het lab is afgesloten met een hordeur
In de sluis hangt een UV lamp om eventueel ontsnapte muggen te doden
Er is een kapstok met jassen, die ter plekke aan en uitgetrokken worden om eventueel uit het lab meegevoerde muggen niet verder te verspreiden
Alle wanden in het voorportaal en lab zijn wit geschilderd om ontsnapte muggen te kunnen detecteren
In het lab kunnen geen ramen worden geopend
Alle luchttoevoer openingen zijn afgedicht met muggengaas
De muggen worden gehouden in kooitjes van muggengaas die in een gesloten stoof worden bewaard
Bij het hanteren van geïnfecteerde muggen worden deze vooraf en achteraf geteld
Wanneer er een mug is ontsnapt wordt deze opgespoord en gedood
Het lab wordt pas dan verlaten wanneer duidelijk is dat er geen overlevende muggen rondvliegen
Voor het hanteren van de muggen worden ze verdoofd met CO₂ gas