

Advies betreffende: **Transfectie van de primaten malaria parasiet *Plasmodium knowlesi***

Kennisgever: **Stichting Biomedical Primate Research Centre**

COGEM kenmerk
CGM/010305-02

BGGO nummer
GGO 96-061

Datum advies
5 maart 2001

Doel

Deze kennisgeving heeft betrekking op een beschikking waarin klonering van ondermeer malaria antigeen genen in *E.coli* en diverse *Plasmodium spp.*, en infectie van rhesusapen (*Macaca mulatta*) met gemodificeerde parasieten, vergund zijn (DGM/SVS GGO 96-061). Destijds heeft de COGEM over de betreffende aanvraag geadviseerd (CGM/960423-03). De kennisgever verzoekt om een wijziging van de betreffende beschikking waarbij als donorsequenties het DHFR-TS gen en flankerende sequenties worden gebruikt. De kennisgeving omhelst het gebruik van verschillende plasmodium soorten te weten: *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. coatney*, *P. reichenowi*, *P. cynomolgi*, *P. vivax* en *P. falciparum*. In de huidige kennisgeving wordt verzocht om naast de eerder aangemelde handelingen, met 1) bloedmonsters uit dierproeven en met 2) genetisch gemodificeerde micro-organismen in associatie met dieren (*Macaca mulatta*), de muggenstadia van de parasiet toe te voegen, waarbij de muggen gevoed worden op de apen.

Levencyclus van *Plasmodium spp.*

De levencyclus 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 (ex-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 rhesusapen of op in vitro cultures van getransfekteerde parasieten. 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 dierversluis. 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 rhesusapen te infecteren, of om in vitro primaire hepatocyt cultures van rhesusapen of mensen (of HepG2 cellen) te infecteren.

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. Eén daarvan, *Anopheles atroparvus*, is in staat om *Plasmodium* soorten over te dragen die bij de mens malaria veroorzaken waaronder *P. vivax* maar niet *P. falciparum*. De larve van deze mug komt alleen voor in brak water. Voor de ontwikkeling van plasmodium sporozoïten 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.

Een andere in Nederland voorkomende soort, *Anopheles messeae* treedt in Oost Europa op als vector van *P. vivax*. In Nederland zijn geen gevallen bekend waarbij deze mug als vector is opgetreden. Opgemerkt dient te worden dat *Anopheles messeae* mogelijk ook als vector op kan treden voor *P. knowlesi*.

Plasmodium soorten infectieus voor de mens en andere niet humane primaten

Van de genoemde plasmodium soorten zijn *P. falciparum*, *P. vivax* en *P. cynomolgi* infectieus voor de mens. Daarbij veroorzaakt *P. falciparum* bijna alle malaria-gerelateerde humane doden. *P. cynomolgi* is eveneens infectieus voor andere hogere primaten waaronder bijvoorbeeld makaken en bavianen. Van *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P.*

coatneyi en *P. reichenowi* wordt verondersteld dat deze soort specifiek zijn voor non-humane primaten.

Gastheerspecificiteit van plasmodium soorten

Gastheerspecificiteit van plasmodium soorten heeft betrekking op zowel invasie van en ontwikkeling in hepatocyten en erythrocyten. Er zijn verschillende genen beschreven die betrokken zijn bij de herkenning van celtypen. Hoewel men ervan uit gaat dat verschillende genproducten noodzakelijk zijn voor een succesvolle invasie en ontwikkeling van de parasiet, kan geen overtuigend geleverd worden dat expressie van een of enkele genen van een andere plasmodium soort niet zal leiden tot een veranderde gastheerspecificiteit. Om deze reden kan niet uitgesloten worden dat bij genetisch gemodificeerde stammen van *Plasmodium* 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 zou 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.

Inschaling

Transfectie van *Plasmodium*, handelingen met (besmet) apenbloed en analyses van de bloedmonsters dienen plaats te vinden in een C-I faciliteit (4.1.1.3. Bijlage 4 Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM (juni 1998)). Bloed kan bij de apen worden afgenomen middels een venepunctie en opgevangen in een vacutainer bloedbuis. Deze bloedbuis wordt in een gesloten breukvrije doos vervoerd. Centrifugeren van bloed dient plaats te vinden in afgesloten containers. Tevens dienen de werknemers handschoenen te dragen tijdens de werkzaamheden met apenbloed, die gedecontamineerd worden met 70% ethanol alvorens ze weg te gooien. Werknemers dienen er tevens op gewezen te worden dat zorgvuldig gewerkt moet worden ter voorkoming van besmetting door prik- of snijaccidenten. Handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met dieren (*Macaca mulatta*) dienen plaats te vinden in een D-II faciliteit (4.1.4.2. Bijlage 4 Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM (juni 1998)). Aanvullend dient opgemerkt te worden dat ongedierte en met name muggen niet aanwezig mogen zijn. Betreffende de handelingen met genetisch gemodificeerde plasmodia in associatie met dieren (mug/rhesusaap) adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften op te nemen:

Muggen zijn gehuisvest in kooien voorzien van muggengaas, in een speciaal D-II verblijf.

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 anders dan het speciale D-II muggenverblijf worden de muggenkooien niet geopend.

Bovenstaande is met name van belang bij het voeden van de muggen op de apen. De muggenkooi wordt hiertoe gedurende 10 minuten op de borst van de verdoofde aap geplaatst. De muggen steken door het muggengaas heen waarna de aap weer wordt teruggelegd in zijn kooi. Nadat de muggen zijn gevoed worden zij terugvervoerd naar het muggenlaboratorium.

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 waarin speciale voorzieningen zijn getroffen. De COGEM stemt in dit geval 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

Voor het hanteren van de muggen worden ze verdoofd met CO₂ gas.

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.

Werknemers dienen er op gewezen te worden dat zorgvuldig gewerkt moet worden ter voorkoming van besmetting door prik- of snijaccidenten.