Commissie Genetische Modificatie

Advies betreffende: **Reverse genetics van polio- en non-polio enterovirus**

Kennisgever: **Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu**

COGEM kenmerk	BGGO nummer	Datum advies
CGM/021017-01	**GGO 02-225**	**17 oktober 2002**

Inleiding

Polio is een virale ziekte die zich in de keel en de darmen ontwikkelt. De aandoening wordt door spreekseldruppeltjes, door ontlasting of met uitwerpselen besmet voedsel of door besmet water overgedragen. In een aantal gevallen dringt het virus in het ruggenmerg door en ontstaan er verlammingen en gevoelsverlies. Voor polio zijn er tweede verschillende vaccins, het Sabin-vaccin met levend virus (OPV) en het geïnactiveerde Salk-vaccin (IPV). Het OPV heeft als voordeel dat het een betere immuniteit biedt en dat het zich kan verspreiden naar niet-gevaccineerde individuen. Daarnaast wordt het OPV oraal toegediend en is het een goedkoper vaccin dan het IPV. Hierdoor wordt in ontwikkelingslanden voornamelijk het OPV vaccin gebruikt. Het is echter gebleken dat de virusstammen in het OPV door enkele puntmutaties konden terugmuteren tot virulente stammen die verlammingsverschijnselen konden veroorzaken (1; 2; 5).

Om de spreidingseigenschappen (transmissibility) van de wild-type-like poliovirus stammen te bestuderen wil de aanvrager met behulp van de ‘reverse genetics’ techniek poliovirus cDNA sequenties van verschillende stammen combineren om zodoende de determinanten voor de transmissie (of overdracht) te achterhalen. De werkzaamheden betreffen de in vitro vervaardiging en productie van verschillende poliovirussen, mutanten daarvan, en non-poliovirus enterovirus stammen. De te gebruiken polio en non-polio enterovirus stammen behoren binnen de picornavirusfamilie tot de humane enterovirussen. Enterovirussen zijn positief-strengige RNA virussen zonder envelop met een genoomgrootte van ongeveer 7.5 kb (9). Tevens zullen er chimere virussen vervaardigd worden waarbij segmenten van al dan niet gemuteerde poliovirus en non-poliovirus enterovirus stammen met elkaar zullen worden uitgewisseld. De uiteindelijk te vervaardigen recombinate mutante poliovirussen, non-poliovirus enterovirussen en chimere polio-enterovirussen zullen in vitro worden bestudeerd op groei, plaquegrootte en thermosensitiviteit. Voor de in vivo karakterisatiestudies zullen muizen gebruikt worden die transgeen zijn voor de poliovirus receptor PVR (CD155).

Gecoördineerd door de WHO wordt er wereldwijd hard gewerkt om wild-type polio virus uit te roeien (6; 8). Momenteel zit poliovaccinatie nog steeds in het Rijksvaccinatie programma. De risico’s op besmetting vanuit laboratoria in de bevolking nemen na het stoppen van immunisatie toe (3). Het WHO polio-eradicatieprogramma kent twee fases: de pre-eradicatiefase en de post-eradicatiefase. Als gevolg van het polio-eradicatieprogramma van de WHO zijn er nieuwe richtlijnen opgesteld door de WHO

voor het werken met poliovirus in laboratoria. Op dit moment is de pre-eradicatiefase nog van toepassing, waarbij het veiligheidsniveau BSL-2/polio van de WHO wordt uitgevoerd. In de volgende stappen van het eradicatieprogramma zullen steeds strengere eisen gesteld gaan worden. De WHO streeft ernaar om uiteindelijk in de post-eradicatiefase over te stappen op veiligheidsniveau BSL-3/polio (8). Recombinant DNA werkzaamheden met poliovirus worden nu ingeschaald op basis van de richtlijnen van de pre-eradicatiefase, zoals opgesteld door de WHO. Als gevolg van deze nieuwe richtlijnen is de COGEM om advies gevraagd over de inschalingscriteria voor het werken met poliovirus zoals omschreven in het onderzoek van de aanvrager.

Overweging en Advies

In de huidige pre-eradicatiefase behoort wild type poliovirus tot de pathogeniteitsklasse 2 (7). Bij de voorgestelde inschaling door Bureau GGO is uitgegaan van de door de WHO voorgeschreven richtlijnen met betrekking tot inperkingsniveau en de te hanteren werkzaamheden.

- In onderdeel 2 worden sequenties van poliovirus en chimaere virussen gekloneerd in E. coli. Het inschalingsvoorstel voor de pre-eradicatiefase is op C-I niveau. De COGEM is van mening dat indien ervan uitgegaan wordt dat poliovirus tot de pathogeniteitsklasse 2 behoort, een inschaling op VMT niveau gerechtvaardigd is (7). In voorgaande adviezen van de COGEM is er immers steeds geadviseerd waarbij poliovirus als een klasse 2 virus beschouwd is. Daarbij is het poliovirus een RNA virus, terwijl er met cDNA gewerkt wordt in E. coli, waarin tevens de poliovirus promoter niet functioneel is. Hierdoor is de kans op het ontstaan van infectieus poliovirus verwaarloosbaar klein.

- In onderdeel 6, waarbij RNA getransfecteerd wordt in zoogdiercellen en waarbij er virusproductie en infectie van zoogdiercellen plaatsvindt, is het inschalingsvoorstel op C-II niveau voor de pre-eradicatiefase. Ook hierbij is de COGEM van mening dat wild type poliovirus in de huidige pre-eradicatiefase beschouwd wordt als een pathogeniteitsklasse 2 virus. De chimaere virussen en mutanten die zullen worden gebruikt kunnen volgens de COGEM nooit een hogere pathogeniteit of virulente veroorzaken dan het wild type poliovirus. Een lagere inschaling op C-I niveau zal dan ook in de pre-eradicatiefase de risico’s voor mens en milieu voldoende waarborgen (7).

- Handelingen met cellen en weefsels zoals omschreven in onderdeel 8 dient opgesplitst te worden in pre- en post-eradicatiefase. De reden hiervoor is dat er naast non-polio enterovirussen ook gewerkt wordt met full-length sequenties van oral polio vaccin (OPV).

- De COGEM is voorts van mening dat ook onderdeel 10 lager ingeschaald moet worden naar C-I niveau voor de pre-eradicatiefase. Het creëren van mutanten van wild type of wild-type-like poliovirus en chimaere virussen zullen niet leiden tot een hogere pathogeniteit of virulentie ten opzichte van wild type poliovirus. Inschaling op basis van pathogeniteitsklasse 2 voor wild type poliovirus op C-I niveau is volgens de COGEM dan ook gerechtvaardigd (7).

De COGEM komt tot de conclusie dat zij niet kan instemmen met de voorgestelde hogere inschaling voor de pre-eradicatiefase. Indien de post-eradicatiefase bereikt wordt, met als gevolg een wereldwijde stopzetting van het poliovaccinatie programma, dan acht de COGEM een pathogeniteitsklasseverhoging van klasse 2 naar pathogeniteitsklasse 3 voor het poliovirus noodzakelijk. De COGEM gaat wel akkoord met het strengere inschalingsvoorstel voor de post-eradicatiefase zoals opgesteld door Bureau GGO. In de aanvullende voorschriften voor de post-eradicatiefase wordt voorzien dat alleen gevaccineerde medewerkers kunnen deelnemen aan activiteiten met wild-type polio(-like) virus of potentieel met polio(-like) virus besmet materiaal. Dit betekent dat laboratoriummedewerkers op latere leeftijd nog primo gevaccineerd moeten kunnen worden. Bij het op latere leeftijd vaccineren tegen het pokkenvirus met het pokkenvaccin zijn er problemen opgetreden in de vorm van fatale pokkenbesmettingen van de gevaccineerde persoon (4). De COGEM voorziet echter geen problemen bij de laboratoriummedewerkers die op latere leeftijd nog primo gevaccineerd dienen te worden tegen polio aangezien het te gebruiken IPV vaccin bestaat uit niet-levend virus en er dus geen risico bestaat op infectie.

1. Boot, H. J. and Kimman, T. G. (2002). Infectieziekten Bulletin 7, blz. 247-252
2. Cherkasova, E. A., Korotkova, E. A., Yakovenko, M. L., Ivanova, O. E., Eremeeva, T. P., Chumakov, K. M., and Agol, V. I. (2002). J Virol 76, blz. 6791-9
3. Dowdle, W. R., Gary, H. E., Sanders, R., and Loon, A. M. (2002). Bull World Health Organ 80, blz. 311-6
4. Frey, S. E., Couch, R. B., Tacket, C. O., Treanor, J. J., Wolff, M., Newman, F. K., Atmar, R. L., Edelman, R., Nolan, C. M., and Belshe, R. B. (2002). N Engl J Med 346, blz. 1265-74
5. Kew, O., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., Burns, C., Shaw, J., Garib, Z., et al. (2002). Science 296, blz. 356-9
6. Nomoto, A. and Arita, I. (2002). Nat Immunol 3, blz. 205-8
7. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
8. WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses, Second edition. (2002).
9. Wimmer, E., Hellen, C. U., and Cao, X. (93). Annu Rev Genet 27, blz. 353-436