



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

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

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
Alg-prion-inact.c01	29 maart 2004	CGM/040526-01	26 mei 2004
Onderwerp	Aanvullende adviesvraag inactivatie van prionen		

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een aanvullende adviesvraag van Bureau GGO over een eerder uitgebracht COGEM advies (CGM/040212-03) betreffende een wijzigingsverzoek van het Centraal Instituut voor Dierziekte te Lelystad op de bestaande vergunning GGO 94-131/2 deelt de COGEM u het volgende mee.

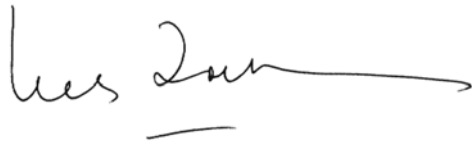
Samenvatting

De COGEM heeft eerder advies uitgebracht over handelingen met transgene muizen die voorzien zijn van 'Prion Protein' (PrP) genen van schaap, rund en varken. In het betreffende advies (CGM/040212-03) wijst de COGEM erop dat, gezien de aard van het infectieuze prion agens, goede maatregelen ter bescherming van de medewerker vereist zijn, zoals maatregelen voor het inactiveren van met prionen besmet materiaal. Besmet afval dient te worden geïnactiveerd door incubatie in 2 molair natronloog gevolgd door een minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten van het natronlooghoudende afval. Hierbij is de duur van de 2 molair natronloog-behandeling voorafgaand aan de verhitting niet van invloed.

Bureau GGO heeft aan de COGEM de vraag gesteld of incubatie van besmet afval gedurende 60 minuten met 1 molair natronloog gecombineerd met een minimale verhitting van 121°C gedurende 30 minuten eveneens als afdoende kan worden beschouwd. In onderhavig advies geeft de COGEM aan dat meerdere methoden, waaronder de methode zoals aangegeven door Bureau GGO, als effectief kunnen worden beschouwd, maar dat haar voorkeur uitgaat naar de methode zoals aangegeven in haar vorige advies (CGM/040212-03).

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Inactiveren van prionen

COGEM advies: CGM/040526-01

Inleiding

Op 13 februari jl. heeft de COGEM advies (CGM/040212-03) uitgebracht betreffende een wijzigingsverzoek van het Centraal Instituut voor Dierziekte te Lelystad op de bestaande vergunning GGO 94-131/2. De wijziging betrof de toevoeging van handelingen met transgene muizen die voorzien zijn van 'Prion Protein' (PrP) genen van schaap, rund en varken. PrP-eiwitten worden geassocieerd met verschillende vormen van spongieuze encephalopathieën (SE) zoals Creutzfeld-Jacob Disease (CJD) bij mensen, scrapie bij schapen en Bovine Spongieuze Encephalopathie (BSE) bij runderen.

De COGEM is destijds verzocht een beschouwing te geven met betrekking tot de conversie van het niet-pathogene PrP^c-eiwit naar het pathogene PrP^{sc}-eiwit in transgene muizen en te beoordelen of de voorgestelde aanvullende voorschriften voldoende bescherming bieden voor mens en milieu.

In het betreffende advies wijst de COGEM erop dat, gezien de aard van het infectieuze agens, de wegen waarlangs besmetting kan plaatsvinden en de zeer ernstige gevolgen die een dergelijke besmetting met zich meebrengt, goede maatregelen ter bescherming van de medewerker vereist zijn. Op dit moment is therapeutische interventie niet mogelijk en heeft deze ziekte altijd een fatale afloop. De COGEM geeft derhalve in haar advies een aantal aanvullende voorschriften die door de aanvrager in acht genomen dienen te worden.

Deze voorschriften behelzen zowel maatregelen ter voorkoming van besmetting van personen als maatregelen voor het inactiveren van met prionen besmet materiaal. Als inactivatiemethode werd door de COGEM het gebruik van NaOH in combinatie met autoclaveren voorgeschreven. Afval dient te worden geïnactiveerd door incubatie in 2M NaOH gevolgd door een minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten. Hierbij is de duur van de 2M NaOH-behandeling niet van invloed.

De aanvrager heeft in een reactie richting Bureau GGO aangegeven dat inactivatie van besmet afval door minimaal 1 uur incubatie in 1M NaOH bij kamertemperatuur gevolgd door een minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten een eender resultaat bewerkstelligt. De aanvrager verwijst hierbij naar een review artikel waarin een overzicht gegeven wordt van methoden die gebruikt zijn om SE-agens te inactiveren (1).

Mede naar aanleiding van deze reactie van de aanvrager heeft Bureau GGO aan de COGEM de vraag gesteld of inactivatie van afval met 1M NaOH gecombineerd met een minimale verhitting van 121°C gedurende 30 minuten als afdoende kan worden beschouwd.

Inactiveren van prionen

Naast het gegeven dat een geïnfecteerde cel niet in staat is prionen af te breken (2) blijkt ook buiten het organisme het inactiveren van het eiwit niet eenvoudig. Prionen zijn bestand tegen vele standaard inactivatieprocedures en zelfs meerdere malen of bij hogere temperaturen autoclaveren blijkt niet altijd afdoende (1). Prionen zijn thermostabiel waarbij grote verschillen in thermostabiliteit tussen stammen zijn waargenomen (3). Daarnaast zijn prionen resistent tegen veel gebruikte desinfectantia, zoals alcohol en aceton, maar ook tegen agressieve stoffen zoals formaldehyde, HCl, H₂O₂ en fenolen. Behandelingen met uitsluitend een Na-hypochloriet-oplossing of een NaOH-oplossing zorgen voor een sterk verminderde activiteit, maar werken niet volledig (2).

In de literatuur wordt tevens melding gemaakt van behandelingen die wel leiden tot volledige inactivatie. Incuberende van SE-agens in een NaOH-oplossing gevolgd door autoclaveren blijkt effectief (4,5,6). Hierbij worden meerdere methoden gerapporteerd die onderling verschillen in NaOH-concentraties, in incubatie- en autoclaveertijden (zie tabel 1). Daarnaast wordt koken van het besmet materiaal in een NaOH-oplossing als effectief aangemerkt (7).

Tabel 1: inactivatie van prionen door NaOH-behandeling te combineren met autoclaveren

Meth.	Auteurs, publicatiejaar	NaOH-behandeling		Autoclaveertijd (min)
		Conc. (M)	Incubatietijd (min)	
1	Taguchi et al., 1991 (4)	1	60	30, 60 en 120
2	Ernst & Race, 1994 (5)	0,09 en 0,9	120	60
3	Taylor et al., 1997 (6)	2	0 en 60	30

De voornoemde inactivatie-experimenten zijn uitgevoerd met besmet hersenweefsel van muizen. Voor muizen zijn thans geen prionziekten bekend. Echter het is mogelijk gebleken om muizen en hamsters te infecteren via experimentele overdracht door intracerebrale toediening of voeding van SE's. Door het gebruik van transgene hamsters en muizen kan de soortbarrière worden omzeild waardoor deze dieren als proefmodel gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling van de ziekte te bestuderen (8,9). De stammen in voornoemde methoden zijn verkregen door seriële passages van CJD-, scrapie- en BSE-agens in laboratoriummuizen dan wel hamsters.

Taguchi et al. (4) inactiverde agens van de CJD-stam Kitasoto-1. Hierbij werd als agensconcentratie 10^{5,8} ID₅₀/g hersenweefsel genomen. Een concentratie die onder de

waarde ligt die aangetroffen kan worden in hersenen. Zowel in dierlijke als menselijke hersenen zijn concentraties van 10^8 ID₅₀/g hersenweefsel aangetoond (10).

Ernst & Race (5) gebruikte voor hun experimenten wel weefsel met deze hoge concentratie en maakte daarbij gebruik van de meer thermostabiele scrapiestam 263K.

Ook Taylor et al.(6) namen uitgangsmateriaal met een concentratie van 10^8 ID₅₀/g hersenweefsel. Zij voerden hun experimenten uit met de zeer thermostabiele scrapiestam 22A. In tegenstelling tot Taguchi et al. (4) en Ernst & Race (5) maakten Taylor et al. (6) geen gebruik van homogenaten maar kozen voor het gebruik van intact hersenweefsel. Aangetoond is dat inactivatie door middel van autoclaveren van prionen in homogenaten met een hogere effectiviteit plaatsvindt dan van prionen in intact weefsel (6).

Naast de combinatie NaOH-behandeling gevolgd door autoclaveren wordt koken in loog ook als effectief omschreven. Na het koken van agens van de zeer thermostabiele BSE-stam 301V gedurende 1 min. in 1 M NaOH werd geen agensactiviteit meer gevonden (7).

In acht genomen dient te worden dat bij de gebruikte validatiemethode gebruik wordt gemaakt van muizen. Het agens wordt na de NaOH-behandeling en autoclaveren toegediend aan muizen, waarna deze beoordeeld worden op de aanwezigheid van symptomen. De levensduur van muizen bedraagt circa twee jaar. Het is niet uit te sluiten dat deze tijd te kort is voor de ontwikkeling van het ziektebeeld. Derhalve is overschatting van de inactivatie-efficiëntie bij lage infectiviteit naar de mening van de COGEM niet uit te sluiten.

Overweging

De door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode is overeenkomstig de methode van Taguchi et al (4), 60 min. incuberen in 1M NaOH gevolgd door 30 min. autoclaveren bij 121°C. Aangetoond werd dat een prion agens met relatief lage besmettingsgraad met behulp van deze methode op effectieve wijze vernietigd kan worden.

Zowel Ernst & Race (5) als Taylor et al. (6) gebruikten voor hun experimenten infectieus materiaal met hogere titers. Titers waarvan aannemelijk is dat deze na ophoping aanwezig kunnen zijn in hersenweefsel (10). Tevens maken Ernst & Race (5) en Taylor et al. (6) gebruik van meer thermostabiele stammen (263K en 22A) dan Taguchi (4) (Kitasoto-1). Daarnaast namen Taylor et al. (6) intact weefsel als uitgangsmateriaal hetgeen in vergelijking met homogenaten als moeizamer te inactiveren beschouwd wordt (6).

Bij de methode omschreven door Ernst & Race (5), met vergelijkbaar uitgangsmateriaal, homogenaat, als Taguchi et al. zijn zowel de incubatietijd in loog als de autoclaveertijd verdubbeld. Wel kan de NaOH-concentratie terug gebracht worden

naar een mindere corrosieve oplossing van 0,09N. De methode van Taylor et al. (6) is praktisch makkelijker uitvoerbaar. De incubatiestap kan overgeslagen worden en het natronlooghoudende afval kan direct geautoclaveerd worden. Deze methode heeft wel als nadeel dat met een meer corrosieve 2M NaOH-oplossing wordt gewerkt.

Hoewel de COGEM van mening is dat, op basis van de eerder genoemde literatuur, geen van de voornoemde methoden als niet-effectief beschouwd kunnen worden, gaat haar voorkeur uit naar de methode van Taylor et al. (6) zoals zij eerder aangaf in haar advies d.d. 13 februari 2004. De meer stringente condities waaronder het experiment is uitgevoerd bepalen hierbij de keuze.

Overigens merkt de COGEM op dat publicaties en gegevens over inactiveren van prionen niet systematisch van aard zijn. In de verschillende publicaties is gebruik gemaakt van verschillende stammen, loogconcentraties, inactivatietijden en autoclaveerregimes. In geen van de beschreven experimenten zijn dosisrespons-curves bepaald. Hierdoor kan niet met zekerheid gesteld worden welke minimale condities tot inactivatie van SE-agens leiden.

Conclusie en advies

De COGEM is gezien het bovenstaande van mening dat geen van de methoden voor het inactiveren van met SE-agens besmet materiaal zoals aangegeven in tabel 1 (blz. 2) als niet-effectief kunnen worden beschouwd. De voorkeur van de COGEM gaat hierbij uit naar de methode van Taylor et al. (6): incubatie in 2M NaOH gevolgd door autoclaveren gedurende 30 min. bij 121°C van het natronlooghoudende afval.

De COGEM wijst er nogmaals op dat gezien de onvolledige werking van verschillende desinfectanten de COGEM het noodzakelijk acht werkplekken te voorzien van materiaal dat geautoclaveerd kan worden.

Referenties

- (1) Taylor, D.M. (2000). Inactivations of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *The Veterinary Journal*, 159: 10-17.
- (2) Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95: 13363-13383.
- (3) Taylor, D.T., fernie, K., Steele, P.J., McConnell, I. and Somerville, A. (2002). Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents. *Journal of General Virology* 83: 3199-3204.
- (4) Taguchi, F., Tamai, Y., Uchida, K., Kitajama, R., Kojima, H., Kawaguchi, T., Ohtani, Y. and Miura, S. (1991). Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Archives of Virology* 119: 297-301
- (5) Ernst, D.R. and Race, R.E. (1993). Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *Journal of Virological Methods* 41: 193-202.
- (6) Taylor, D.M., Fernie, K. and McConnell, I. (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Veterinary microbiology* 58:87-91.
- (7) Taylor, D.M. (1999). Transmissible degenerative encephalopathies. Inactivation of the causal agents. In *principles and practice of disinfection preservation and sterilisation*, p.222-236.
- (8) Vilotte, J., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D. and Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *Journal of Virology*, July 2000: 5977-5984.
- (9) Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. and Baron, T. (2001). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *Journal of Virology*, 75: 5328-5334.
- (10) Ramasamy, I., Law, M., Collins, S. and Brooke, F. (2003). Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet* 3: 214-222.