



COMMISSIE
COGEM

GENETISCHE
MODIFICATIE

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 27 juni 2006
KENMERK CGM/060627-01
ONDERWERP Advies inschaling van handelingen met *Leishmania* species (IG 99-225/01)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van werkzaamheden met *Leishmania* species door Intervet International B.V. te Boxmeer, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg) parasieten *Leishmania infantum* en *L. mexicana*. De werkzaamheden betreffen het opkweken en injecteren van de gg parasieten in muizen, hamsters en honden. Daarna volgt analyse van cellen en weefsels afkomstig van de dieren. Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van een vaccin tegen de parasieten voor honden.

De COGEM classificeert de beide *Leishmania* soorten als een pathogeen van klasse 2 omdat de organismen ziekte bij de mens kunnen veroorzaken welke behandelbaar is en waarbij de kans op verspreiding onder de bevolking onwaarschijnlijk is.

De parasieten zijn alleen overdraagbaar bij bloedcontact en niet via aërosolen. Laboratoriummedewerkers kunnen alleen geïnfecteerd raken bij contact tussen wondjes van de medewerker en besmet materiaal.

De COGEM is van mening dat de ggo's door de modificatie (deletie van enkele virulentiefactoren en insertie van onder andere antibiotica resistentiegenen) minder virulent zijn.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om de werkzaamheden met de gg parasieten uit te voeren op inperkingniveau ML-II. Handelingen met dieren in associatie met de gg parasieten, schaaft de COGEM in op DM-II niveau. Om eventuele risico's voor de medewerker te beperken stelt de COGEM aanvullende voorschriften, zoals het dragen van handschoenen tot over de mouw van de laboratoriumjas.

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 on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos

Dr. R.C. Zwart

Inschaling van handelingen met *Leishmania infantum* en *Leishmania mexicana*

COGEM advies CGM/060627-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO betreffende de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) *Leishmania* species. De aanvrager beschikt reeds over een vergunning voor werkzaamheden met *Leishmania infantum* als vector en wil hier *L. mexicana* aan toevoegen. Om meer inzicht te geven in de risico-analyse zal in eerste instantie worden ingegaan op enkele kenmerken van de organismen. Hierna worden de handelingen met de genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) beschreven. Ten slotte komt de risicobeoordeling aan bod.

L. infantum* en *L. mexicana

De parasieten *L. infantum* en *L. mexicana* maken deel uit van het geslacht *Leishmania* (familie van de *Trypanosomatidae*) dat bestaat uit enkele tientallen species. Deze organismen worden via een beet van besmette vrouwelijke zandvliegen (genus *Phlebotomus* en *Lutzomyia spp.*) overgedragen op mens en zoogdier. Na een incubatietijd van enkele weken tot vele maanden kunnen patiënten de ziekte leishmaniasis ontwikkelen. De ziekte komt veelvuldig voor in het Middellandse Zeegebied, Midden-Oosten, Zuidwest-Azië en Centraal en Zuid-Amerika. Elk jaar ontwikkelen ongeveer 2 miljoen mensen Leishmaniasis (1;2). Binnen Europa komen zowel *L. infantum* als *L. mexicana* voor in het Middellandse Zeegebied.

Leishmaniasis is grofweg onder te verdelen in een visceraal (ingewanden) en cutaan (huid) type (2). *L. infantum* veroorzaakt viscerale leishmaniasis. De parasiet kan zich via de bloedbaan verplaatsen naar het beenmerg, de milt en de lever en daar voor een vergroting van de betreffende organen zorgen. Daarnaast heeft de infectie een remmende werking op het immuunsysteem, waardoor de gastheer immuungecompromiteerd kan raken. Dit kan weer leiden tot andere aandoeningen (1). In het geval een patiënt immuungecompromiteerd is, zoals bij HIV, kan een ernstige infectie optreden (3). Zonder een adequate behandeling kan viscerale leishmaniasis de dood tot gevolg hebben (1).

L. mexicana veroorzaakt cutane leishmaniasis, een huidaandoening gekenmerkt door zweren. Deze vorm heeft vaak een milder verloop dan de viscerale leishmaniasis. De ziekte verdwijnt meestal spontaan en is slechts zeer zelden lethaal. Echter, in een aantal

gevallen kan cutane leishmaniasis evolueren naar een mucocutane vorm, waarbij de huid- en slijmvliezen geïnfecteerd raken. Dit ziektebeeld is ernstiger en kan leiden tot ernstige gezichtsafwijkingen (1).

Beide vormen van leishmaniasis zijn bij een tijdige diagnose goed te behandelen. In Nederland komt de zandvlieg niet voor en is leishmaniasis een importziekte met enkele tientallen patiënten per jaar (3).

Besmettingsroute

Zoals hierboven vermeld is, vormt de vrouwelijke zandvlieg de belangrijkste transmissieroute van *L. infantum* en *L. mexicana*. De vliegen raken zelf besmet nadat ze bloed van besmette personen of dieren hebben opgezogen. Honden vormen het reservoir voor *L. infantum* en knaagdieren zijn het belangrijkste reservoir voor *L. mexicana* (3;4;5). Dit maakt dat Leishmaniasis een zoönose is, oftewel een ziekte die van dieren op mensen kan worden overgebracht.

Nadat de vliegen besmet zijn geraakt, maken de parasieten in de darmen van de vlieg een ontwikkelingscyclus door, waarna de parasieten bij een volgende bloedmaaltijd via het speeksel van de vlieg in de huid van de gastheer worden geïnjecteerd (2).

In afwezigheid van de zandvlieg zijn een aantal andere transmissieroutes mogelijk die overigens zeer zeldzaam zijn. Transmissie van *L. infantum* is mogelijk via orgaantransplantaties en via bloed, zoals verticale transmissie van moeder naar kind bij zowel hond als mens, bloedtransfusie en het delen van gebruikte naalden (2;3).

Voor laboratoriummedewerkers kunnen enkele van de genoemde transmissieroutes leiden tot een infectie tijdens de werkzaamheden. In de literatuur zijn in de afgelopen 70 jaar wereldwijd twaalf infecties met wildtype *Leishmania* spp. bij laboratoriummedewerkers beschreven. Hiervan werd slechts één infectie veroorzaakt door *L. mexicana* en geen door *L. infantum* (6;7). In het geval van de infectie met *L. mexicana* had de persoon zich in de vinger gesneden waarna de wond enkele uren later onbedoeld doordrenkt raakte met kweekmedium waarin zich parasieten bevonden. De medewerker onderging op dat moment al sinds drie jaar een immunosuppressieve therapie (7).

Van de overige elf laboratoriumbesmettingen met andere *Leishmania* spp. betrof het zeven maal een prikaccident met besmet materiaal. Daarnaast zijn er in twee gevallen infecties ontstaan na een beet van een zandvlieg. Verder is één persoon in 1930 geïnfecteerd geraakt na veelvuldige besmetting van de handen en mond (door pipetteren) met bloed afkomstig van een besmette eekhoorn. In dit geval kon de mogelijkheid op

transmissie via de zandvlieg ook niet geheel uitgesloten worden. Eén persoon kon zich geen blootstelling aan besmet materiaal herinneren (6).

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 1999 geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met *L. infantum* (CGM/991220-04) (8). Destijds zijn de laboratoriumwerkzaamheden ingeschaald op inperkingsniveau C-I (volgens de oude inschalingswijze). Verder dienden de werkzaamheden in associatie met proefdieren op het oude D-II niveau plaats te vinden en handelingen met cellen of weefsels van besmette proefdieren op niveau C-I. De COGEM is destijds uit voorzorg uitgegaan van een overdrachtroute via aerosolen omdat de beschikbare gegevens geen duidelijkheid verschafte. Opgemerkt moet worden dat destijds gesteld is dat het een voorlopig standpunt betrof. Herziening was afhankelijk van het aandragen van nieuwe informatie door de aanvrager (8).

Rekening houdend met een transmissie via aerosolen heeft de COGEM voor alle handelingen aanvullende voorschriften gesteld, zoals het dragen van handschoenen, veiligheidsbril en beschermende neus- en mondmaskers. Daarnaast dienen insecten in de laboratoria bestreden te worden (8).

De adviesvraag

Het doel van het onderzoek is de ontwikkeling van zowel een verzwakt *L. infantum* vaccin als een verzwakt *L. mexicana* vaccin voor honden. Hiertoe worden de genen coderend voor de eiwitten cysteine protease A en B (CPA en CPB) uit de parasieten verwijderd. CPA en CPB zijn virulentiefactoren en spelen een rol bij de overleving en groei van de parasieten in zoogdieren (9). De vervaardiging van de knock-out parasiet (Δ cpa/cpb) vormt geen onderdeel van de adviesvraag.

Aan de knock-out parasieten worden de donorsequenties voor antibiotica resistentiemarkers (waaronder hygromycine en bleomycine) en, in geval van *L. infantum*, 'green fluorescent protein' (en equivalenten) toegevoegd. De parasiet wordt vervolgens in celvrij medium opgekweekt, waarna injectie (subcutaan, intraveneus, intraperitoneaal en intradermaal) in proefdieren plaatsvindt. Voor onderzoek naar een vaccin tegen *L. infantum* worden hamsters, muizen en honden gebruikt. Voor de ontwikkeling van een *L. mexicana* vaccin wordt gebruik gemaakt van hamsters en eventueel van honden. Aan het einde van het onderzoek wordt bloed afgenomen om de immunrespons van de proefdieren te analyseren (serologie en LST). Verder volgt PCR, kweek en microscopie van mogelijk besmet dierlijk materiaal.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over het inschalingsvoorstel van Bureau GGO. Om een uitspraak te kunnen doen over het voorstel, zal in eerste instantie de virulentie van het ggo en de pathogeniteitsklasse van de parasieten beoordeeld worden. Vervolgens wordt ingegaan op mogelijk infectiegevaar voor de laboratoriummedewerker en volgt inschaling van de werkzaamheden.

Het ggo

De aanvrager geeft aan dat Δ cpa/cpb *L. mexicana* door de modificatie verzwakt is. Hij baseert zich hierbij op een studie waarbij muizen van een zeer gevoelige stam (BALB/c) worden geïnfecteerd met de knock-out parasiet (10). Daarnaast heeft de aanvrager een studie verricht naar de virulentie van een cpa of cpb knock-out *L. infantum* in hamsters.

De COGEM is van mening dat *L. mexicana* door de deletie verminderd virulent is ten opzichte van het wildtype. Hierbij moet overigens aangetekend worden dat de door de aanvrager geleverde informatie betreffende *L. mexicana* geen volledig uitsluitsel geeft. In de studie wordt virulentie namelijk bepaald aan de hand van de vorming van zweren. In geval van de knockout parasiet is zweervorming sterk vertraagd of zelfs afwezig. Het is de COGEM echter niet duidelijk of het hier een klinisch relevante attenuatie betreft omdat het verschil in ontwikkeling van zweren ook vanwege een sterk vertraagde groeisnelheid zou kunnen plaatsvinden, terwijl het ziekmakende vermogen gelijk is gebleven.

Verder is de COGEM van mening dat *L. infantum* verminderd virulent is. In de studie is het aantal parasieten in lever en milt bepaald na een incubatieperiode van zes maanden. Op dat moment blijkt dat er geen of nog slechts zeer weinig parasieten aanwezig zijn.

Pathogeniteitsklasse

Micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklassen aan de hand van hun virulentie en hun verspreidingsvermogen onder de bevolking. In een eerder advies heeft de COGEM *L. infantum* geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen (8). Dit betekent: een micro-organisme dat bij mensen (en dieren) een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat (11). Op de lijst van pathogene micro-organismen en agentia (appendix A) van de Regeling ggo, staat *L. mexicana* ook ingedeeld als een klasse 2 pathogeen. Verder classificeren de ARBO-dienst en de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (NVVM) *L. mexicana* ook als klasse 2 pathogeen.

De COGEM is van mening dat de classificatie van zowel *L. mexicana* of *L. infantum* nog steeds van toepassing is aangezien er geen nieuwe inzichten in transmissieroutes

verkregen zijn. De parasiet veroorzaakt weliswaar ziekte bij de mens, maar het is onwaarschijnlijk dat de parasiet zich onder de bevolking verspreidt omdat de belangrijkste vectoren, zandvliegen, in ons land ontbreken. Overdracht via andere wegen is mogelijk, maar deze routes zijn zeldzaam. Verder is de ziekte goed behandelbaar (zie volgende paragraaf).

Kans op infectie en de mogelijke behandeling

Om te beoordelen of laboratoriummedewerkers kans lopen op een infectie met *L. infantum* of *L. mexicana*, die overigens verzwakt zijn, dienen de besmettingsroutes in overweging genomen te worden.

Zoals eerder gesteld is, verloopt de besmettingsroute bijna altijd via de zandvlieg. Aangezien de zandvlieg niet in Nederland is aangetroffen is de COGEM van mening dat de kans op een besmetting via deze route verwaarloosbaar klein is.

Daarentegen bestaat voor de medewerkers de kans om via een prikaccident of via contact tussen besmet materiaal en wondjes geïnfecteerd te raken. De aanvrager geeft aan dat bij een mogelijke besmetting de wond gedesinfecteerd zal worden met betadinezalf en dat het incident direct gemeld moet worden bij de bedrijfsarts. Verder stelt hij dat de eerste symptomen van leishmaniasis optreden tussen drie en twaalf maanden na besmetting maar dat symptomen ook pas later kunnen optreden.

In een eerder advies betreffende de inschaling van werkzaamheden met *L. infantum*, heeft de COGEM gesteld dat uit de door de aanvrager aangeleverde informatie en de beschikbare literatuur niet af te leiden was of aërosoloverdracht uitgesloten kon worden (8). Destijds is de COGEM er daarom bij de inschaling van uitgegaan dat transmissie via aërosolen mogelijk zou kunnen zijn. De COGEM heeft echter het voorbehoud gemaakt dat de inschaling gewijzigd kan worden indien de kennisgever aanvullende gegevens verstrekt over de mogelijkheden van aërosoltransmissie van het pathogeen.

Voor het onderhavige advies heeft de COGEM naast het raadplegen van literatuur en eigen experts, ook externe deskundigen (waaronder een klinisch parasitoloog) benadert over de mogelijkheid tot aërosoltransmissie. In de literatuur is nimmer melding gemaakt van aërosoltransmissie ondanks wijdverspreid onderzoek, en de externe deskundigen geven aan dat een dergelijke overdrachtswijze niet plaatsvindt. Sinds het uitbrengen van het eerdere COGEM advies is een studie gepubliceerd naar *Leishmania* infecties bij laboratoriummedewerkers. Hieruit blijkt dat bij medewerkers slechts zeer zelden een infectie optreedt. Indien toch infecties optreden is bloedcontact altijd de oorzaak en nooit aërosoloverdracht. De COGEM concludeert daarom dat op grond van de literatuur, de pathogeniteitsklasse, de door de COGEM benaderde externe deskundigen en de aard van het pathogeen, aangenomen kan worden dat het bekend zou zijn wanneer de parasieten

aërosol overdraagbaar zijn. Aangezien dit niet bekend is, is de COGEM van mening dat *L. infantum* en *L. mexicana* niet aërosol overdraagbaar zijn.

De COGEM is van mening dat indien klachten optreden de medewerker direct contact dient op te nemen met de bedrijfsarts zoals ook door de aanvrager is aangegeven, waarna behandeling volgt. In Nederland is de meest voorkomende behandeling van een *L. mexicana* infectie een combinatie van cryotherapie (het doden van besmette huidcellen door bevriezing met behulp van vloeibare stikstof) en intra-lesionale injecties met vijfwaardige antimoonpreparaten (geneesmiddel op basis van zware metalen) (12). Ook lokale behandeling met pentamidine (een antiprotozoicum) met cryotherapie is mogelijk. Een infectie met *L. infantum* wordt ook behandeld met vijfwaardig antimoonverbindingen. Bij falen van deze therapie kan het antibioticum amfotericine B gebruikt worden (3;4).

Een vaccin tegen *Leishmania* is nog niet voorhanden. In de literatuur is al verschillende malen het gebruik van preventieve *Leishmania* behandelingen beschreven. Het nadeel van een dergelijke therapie is dat de meest effectieve methodes via injectie moeten worden toegediend. Een effectief, goed-verdraagbaar, oraal toe te dienen profylaxe is nog niet beschikbaar (3;4;6).

Inschaling

De parasieten *L. infantum* en *L. mexicana* zijn geclassificeerd als klasse 2 pathogenen. Daarnaast zijn de ggo's minder virulent door de deletie van enkele virulentiefactoren. De modificaties veranderen de transmissieroute niet en de toegevoegde antibiotica resistentiegenen hebben geen gevolg voor de behandeling van een eventuele infectie van een laboratoriummedewerker aangezien andere middelen worden gehanteerd.

De COGEM komt daarom tot de volgende inschaling. Handelingen met gg-*L. infantum* en gg-*L. mexicana*. (alsmede handelingen met cellen en weefsels afkomstig van besmette dieren) kunnen uitgevoerd worden op inperkingsniveau ML-II. Hierbij acht zij aanvullende voorschriften noodzakelijk. De werkzaamheden dienen uitgevoerd te worden in een klasse-II veiligheidskabinet. Daarbij dienen medewerkers handschoenen te dragen tot over de mouw van de laboratoriumjas. Het kabinet alsmede de handschoenen minimaliseren mogelijk contact door spatten of morsen van hoge concentraties *Leishmania* in kweekmedium en (micro)wondjes. Dit maakt de kans op een eventuele infectie verwaarloosbaar klein.

De COGEM acht het verder noodzakelijk om de huid te bedekken in geval wondjes (of eczeem) aanwezig zijn. De COGEM acht het echter niet noodzakelijk om

medewerkers die aan eczeem lijden per definitie uit te sluiten. De COGEM is van mening dat uitsluiting niet noodzakelijk is wanneer het eczeem zich bevindt op plaatsen welke af te dekken zijn (met bijvoorbeeld handschoenen of kleding), zodat direct contact met besmet materiaal vermeden wordt.

Verder adviseert de COGEM om handelingen met zowel kleine (muis, hamster) als grote (hond) proefdieren in associatie met ggo's op DM-II niveau uit te voeren. De COGEM is van mening dat inschaling op DM-II niveau de veiligheid van de medewerker voldoende waarborgt. Het verschil tussen een DM-II en een DM-III verblijf betreft het tegengaan van verspreiding van ggo's in het milieu via aërosolen. Een DM-III verblijf biedt de medewerker echter weinig extra veiligheid. Dit laatste en het feit dat overdracht van de ggo's slechts mogelijk is via contact tussen besmet materiaal en wondjes, en niet door aërosoloverdracht, rechtvaardigt een DM-II inschaling.

Om de veiligheid van de medewerkers verder te vergroten dienen de volgende aanvullende maatregelen in acht genomen te worden. Het betreft het dragen van handschoenen tot over de mouw van de laboratoriumjas. Ook hier is de COGEM van mening dat medewerkers met eczeem (of wondjes) niet uitgesloten moeten worden wanneer het eczeem zich op af te dekken plaatsen bevindt.

Concluderend adviseert de COGEM om handelingen met *L. infantum* en *L. mexicana* uit te voeren op ML-II niveau. Werkzaamheden met dieren in associatie met de genoemde parasieten kunnen, naar de mening van de COGEM, uitgevoerd worden op DM-II niveau. Als aanvullende voorschriften acht de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de laboratoriumjas noodzakelijk.

Referenties

Geraadpleegde literatuur

1. De Steenwinkel, J.E.M., Verweij, J.J. en Gyssens, I.C. (2005). Diagnostiek van leishmaniasis. Nederlands tijdschrift voor medische microbiologie 3: 63-66.
2. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. en Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. Lancet 366: 1561-1577.
3. Pinelli, E. en Kortbeek, L.M. (2000). Leishmaniasis bij mensen en honden, niet alleen een tropische ziekte. Infectieziekten bulletin 11(11): 235-237.
4. Schallig, H., Pinelli, E., Verweij, J. en Sauerwein, R. (2005). Leishmania infantum. Nederlandse vereniging voor parasitologie. Internet: http://www.medische-parasitologie.nl/parasieten/ileishmania_infantum.html (16 juni 2006).
5. Gramiccia, M. en Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol. 35: 1169-1180.
6. Herwaldt, B.L. (2001). Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin. Microbiol. Rev. 14(4): 659-688.
7. Knobloch, J. en Demar, M. (1997). Accidental Leishmania mexicana infection in an immunosuppressed laboratory technician. Trop. Med. Int. Health 2(12): 1152-1155.
8. COGEM advies CGM/991220-04. COGEM (1999). Advies kennisgeving GGO 99-225.
9. Mottram, J.C., Coombs, G.H. en Alexander, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. Curr opin microbial 7: 375-381.
10. Alexander, J., Coombs, G.H. en Mottram, J.C. (1998). Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 respons. J. Immunol. 161: 6794-6801.
11. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004.
12. Schallig, H., Pinelli, E., Verweij, J. en Sauerwein, R. (2005). Leishmania mexicana. Nederlandse vereniging voor parasitologie. Internet: http://www.medische-parasitologie.nl/parasieten/ileishmania_mexicanai.html (16 juni 2006).

Geraadpleegde externe deskundigen

- Drs. L.M. Kortbeek. Arts microbioloog, laboratorium voor infectieziektediagnostiek en screening, RIVM te Bilthoven.
- Dr. H.D.F.H. Schallig. Biomedisch onderzoek. Koninklijk Instituut voor de Tropen te Amsterdam.