

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

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

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
IG 03-046/02.c01	20 december 2005	CGM/060127-01	27 januari 2006
IG 03-046/02.c02	19 januari 2006		

Onderwerp
Advies inactivatie van prionen in vloeibaar afval

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende een wijzigingsverzoek van de Stichting Sanquin Bloedvoorziening te Amsterdam op de bestaande vergunning IG 03046/02 deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting


De COGEM is gevraagd te adviseren over een inactivatiemethode voor prioneiwitten in vloeibaar afval. De aanvrager maakt in zijn experimenten gebruik van een transgene muizencellijn waarin het prioneiwit (PrP)-gen van schaap is ingebracht. Na infectie met infectieus scrapie-agens zullen deze cellijnen pathogeen prioneiwit produceren. Deze prioneiwitten zijn zeer stabiel en gangbare inactivatiemethoden volstaan veelal niet. Specifieke inactivatiemethoden zijn daarom vereist.

Voor het inactiveren van vloeibaar restafval, waarin relatief kleine hoeveelheden van het pathogene prioneiwit zullen achterblijven, verzoekt de aanvrager gebruik te mogen maken van een inactivatiemethode waarbij het vloeibaar afval op 0.1M NaOH wordt gebracht, gevolgd door een incubatie van 5 uur bij 90°C. De aanvrager heeft ter onderbouwing van deze methode experimentele data overlegd met gegevens over inactivatiemethoden waarbij zowel oplopende natronloogconcentraties als oplopende pH-waarden in combinatie met verhitting worden toegepast.

Deze gegevens tonen onder meer aan dat bij een pH-waarde van 12 of hoger, in combinatie met verhitting bij minimaal 80°C, volledige inactivatie wordt bereikt. De COGEM sluit niet uit dat, in dit specifieke geval, bij het gebruik van NaOH een pH12 of hoger niet wordt bereikt. De COGEM adviseert derhalve om in plaats van de te inactiveren oplossing op 0.1M NaOH te brengen, deze op minimaal pH12 te stellen voorafgaande aan incubatie gedurende 5 uur bij 90°C.

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 'Bastiaan Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

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

Expressie van prioneiwitten in muizencellijnen; Inactivatie van prionen in vloeibaar afval

COGEM advies CGM/060127-01

Inleiding

De onderhavige adviesvraag betreft een wijzigingsverzoek op de bestaande vergunning IG 03-046/02 van de Stichting Sanquin Bloedvoorziening met de titel 'Expressie van cellulaire prioneiwitten en surrogaatmarkers voor 'transmissible spongiform encephalopathies' in bacteriën, gistcellen en dierlijke cellijnen. De wijziging betreft de toevoeging van een inactivatiemethode voor prionen in vloeibaar afval. De COGEM is gevraagd of de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode als afdoende kan worden beschouwd.

Prionziekten

Prioneiwitten worden geassocieerd met de verschillende vormen van overdraagbare spongieuze encephalopathieën (TSE's). TSE's zijn fatale neurale aandoeningen die zowel bij mens als dier voorkomen. De meest bekende vormen zijn de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD) en Koeroe bij de mens, Bovine Spongieuze Encephalopathie (BSE) in runderen en Scrapie in schapen en geiten (1).

De ziekte wordt veroorzaakt zich door de aanwezigheid van zeer stabiele pathogene protease-resistente eiwitten in de hersencellen. Deze zogeheten 'prion (van proteinaceous infectious) proteïnes' of PrP^{sc}-eiwitten (waarbij sc verwijst naar scrapie), hopen zich op in hersencellen. Uiteindelijk leidt de ziekte tot afbraak van de hersenen. Door de vacuoles die in het hersenweefsel ontstaan, vertonen aangetaste hersenen enige gelijkenis met sponzen, vanwaar de naam spongieuze encephalopathie (2). Op dit moment is therapeutische interventie niet mogelijk en heeft de ziekte altijd een fatale afloop.

De precursor van het PrP^{sc}-eiwit is een eiwit dat ook in cellen van het zenuwstelsel van gezonde dieren wordt aangetroffen. Dit eiwit dat PrP^c wordt genoemd (waarbij de c voor cellulair staat), wordt door de gastheer zelf gecodeerd en aangemaakt. Over de cellulaire functie van het PrP^c is weinig bekend (3), maar het eiwit komt algemeen voor in zoogdieren. Muizen waarbij het gen is geblokkeerd of verwijderd, zogeheten 'knock-out' muizen, ontwikkelen zich normaal (4). Slechts kleine afwijkingen ten opzichte van de wildtype muizen, waaronder een verhoogde gevoeligheid voor stress, lijken toe te schrijven aan deze deficiëntie (5).

Conversie van PrP^c naar PrP^{sc}

In geïnfecteerde hersenen vindt omzetting van het niet-pathogeen PrP^c-eiwit naar het PrP^{sc}-eiwit plaats. Welke fysische of biochemische veranderingen ten grondslag liggen aan deze conversie zijn nog onduidelijk (3). De aminozuurvolgorde van PrP^c en PrP^{sc} zijn identiek. Dit betekent dat PrP^{sc} wordt gevormd door een post-translatieel proces waarbij de conformatie van het al bestaande PrP^c-eiwit wordt aangepast. De tertiaire structuur van het eiwit wordt omgezet van de zogenaamde α -helix-structuur naar de β -structuur, die rijk is aan β -sheets en daardoor infectieus is (6).

De aanwezigheid van PrP^{sc}-eiwitten werkt katalyserend doordat PrP^{sc}-eiwitten de omzetting van PrP^c naar PrP^{sc}-eiwitten induceren (2). Door de verandering in conformatie van de tertiaire structuur worden de eiwitten resistent voor proteases, hierdoor worden de PrP^{sc}-eiwitten niet afgebroken en aggregeren de eiwitten in de cel. Afsterving van de cel leidt uiteindelijk tot het ontstaan van plagues op de hersenen.

Doorkruisen van soortbarrière

Voor muizen zijn thans geen prionziekten bekend. Echter, het is mogelijk gebleken om muizen en muizencellijnen te infecteren via experimentele overdracht met TSE's (afkomstig van bijvoorbeeld koeien (BSE) en schapen (scrapie)).

Bij de overdracht van prionen is sprake van een soort- of speciesbarrière. De ziekte ontwikkelt zich veel langzamer in muizencellen dan in cellen afkomstig van het dier waaruit het agens afkomstig is.

Door het gebruik van transgene muizen (cellijnen) kan deze soortbarrière worden omzeild. Hiertoe wordt in transgene muizen (cellijnen) het PrP gen van rund of schaap ingebouwd. Aangezien het naast elkaar voorkomen van het muizen- en het transgene PrP-gen leidt tot verstoring van prionvorming en het ziektebeeld, worden in de transgene muizen de soorteigen PrP-genen uitgeschakeld (7,8).

COGEM-adviezen

De COGEM heeft in het verleden een beschouwing gegeven met betrekking tot het ontstaan van prionziekten in transgene muizen en meerdere malen beoordeeld of de door aanvragers voorgestelde methoden om infectieus prion(PrP^{sc})-afval te inactiveren voldoende bescherming bieden voor mens en milieu (CGM/040212-03, CGM/040526-01 en CGM/051028-02 (9,10,11)). PrP^{sc} is een zeer stabiel eiwit dat niet eenvoudig te inactiveren is. Gangbare inactivatiemethoden volstaan veelal niet. Specifieke inactivatiemethoden zijn derhalve vereist.

In haar voorgaande adviezen (9,10,11) 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 een prionziekte 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.

Verzoek tot wijziging

De vergunninghouder heeft een wijzigingsverzoek ingediend waarin onder meer wordt aangegeven dat de voorgeschreven inactivatiemethode (2M NaOH gecombineerd met 30 minuten autoclaveren) praktisch niet haalbaar is. De vergunninghouder is hierdoor genoodzaakt om het afval in lekvrije gesloten containers af te voeren voor verbranding. De aanvrager heeft derhalve om toestemming verzocht om voor het inactiveren van vloeibaar afval een alternatieve methode toe te mogen passen. Het betreft de volgende methode: de oplossing zal op 0.1M NaOH worden gebracht waarna een incubatie van 5 uur bij 90°C volgt.

De aanvrager maakt bij zijn experimenten gebruik van transgene muizencellijnen (MovS6) waarin het prioneiwit (PrP)-gen van schaap is ingebracht. Na infectie van deze cellijnen met infectieus scrapie (PrP^{Sc})-agens zullen deze cellijnen pathogene prioneiwitten produceren. De geproduceerde eiwitten worden gebruikt in verder onderzoek.

De aanvrager geeft bij zijn wijzigingsverzoek aan dat het vloeibare afval geen hoge concentraties van het infectieuze scrapie-eiwit zal bevatten. Het te inactiveren afval betreft het supernatant van de celsuspensie waarin relatief kleine hoeveelheden van het prioneiwit zullen achterblijven. Deze zijn afkomstig uit dode/kapotte cellen of zijn eventuele restanten van het agens waarmee de celsuspensie is geïnfecteerd.

Het vloeibare afval (gemiddeld 160 ml per week, met een maximum van 500 ml per week) zal worden verzameld in 40 liter inactivatievaten die minstens eenmaal per week geïnactiveerd worden op voorgestelde methode. De COGEM is gevraagd te adviseren over deze inactivatiemethode

Overwegingen

In haar vorige advies heeft de COGEM opgemerkt dat publicaties en gegevens over inactiveren van prionen niet systematisch van aard zijn. In de verschillende publicaties wordt gebruik gemaakt van verschillende stammen, loogconcentraties, inactivatietijden en autoclaveerregimes. Daarbij worden soms conflicterende resultaten gevonden bij gebruik van ogenschijnlijk dezelfde techniek en hetzelfde infectieuze prionagens (12).

De COGEM concludeert in haar voorgaande adviezen (CGM/040526-01 en CGM/051028-02) dat niet één methode aangewezen kan worden als zijnde de beste

methode. Meerdere inactivatiemethoden worden door haar als afdoende beschouwd. Wel heeft zij een voorkeur uitgesproken voor de methode zoals deze is opgenomen in de beschikking; het gebruik van 2M NaOH gevolgd door 30 minuten verhitten bij 120°C. Tevens is zij van mening dat praktische overwegingen nooit mogen prevaleren boven de veiligheid van de laboratoriummedewerkers.

Inactivatiemethode: 5 uur incuberen in 0.1M NaOH bij 90°C

Bij het verzoek tot wijziging van de vergunning wordt verwezen naar een presentatie van Dr. Robert Somerville, werkzaam bij het 'Institute for Animal Health' in Edingburgh, die hij gaf tijdens de 'Prion 2005'-bijeenkomst in Düsseldorf op 19 oktober 2005. Drie figuren, waarvan twee grafieken en één tabel afkomstig uit deze presentatie, zijn door de vergunninghouder bijgeleverd ter onderbouwing van de inactivatiemethode.

Somerville maakt in zijn experimenten gebruik van hersenhomogenaat afkomstig van muizen besmet met een muizenaangepaste BSE-stam (301V). Deze stam wordt beschouwd als één van de meest resistente prionstammen. Om te bepalen of prioneiwitten geïnactiveerd kunnen worden door incubatie bij hoge pH-waarden of in natronloog (NaOH) gecombineerd met verhitting heeft hij bioassays met muizen uitgevoerd. Het hersenhomogenaat werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij temperaturen oplopend van 20°C tot 100°C in combinatie met pH-waarden van pH7.4 tot pH13 of oplopende concentraties natronloog van 0.01 tot 1 molair. Na incubatie werden de hersenhomogenaten geneutraliseerd en geïnjecteerd in muizen. De muizen werden gedurende een langere periode (>500 dagen) gecontroleerd op de aanwezigheid van symptomen van prionziekten.

Hersenhomogenaat versus vloeibaar afval

De scapiestam (PG127) waarmee de aanvrager werkt is in vergelijk tot de BSE-stam waarmee Somerville zijn experimenten uitvoerde een zwakkere stam. Daarbij blijkt uit de beschikbare gegevens dat de concentratie infectieus agens in het restafval zeer waarschijnlijk aanzienlijk lager is dan de concentratie BSE-agens in de experimenten van Somerville. De COGEM acht het derhalve aannemelijk dat een inactivatiemethode die werkzaam is voor hersenhomogenaat van BSE-stam 301V eveneens kan volstaan voor vloeibaar afval van scapiestam PG127.

Verhitting in combinatie met pH

De grafieken uit de presentatie van Somerville geven het effect weer van verhogen van de pH-waarde en incubatie op de infectieusiteit van pathogeen prioneiwit. De grafieken tonen aan dat verhogen van de pH van het hersenhomogenaat tot pH13 een significante reductie van het pathogeen prioneiwit tot gevolg heeft. Hierbij moet opgemerkt worden dat het op pH13 brengen van het hersenhomogenaat en incuberen

gedurende 30 minuten onvoldoende is voor volledige inactivatie. Muizen die het behandelde agens toegediend kregen, vertoonden, zij het in een veel later stadium, symptomen.

De bijgeleverde tabel toont aan dat verhitten van een oplossing met hoge pH deze reductie versterkt. Bij pH13 en 30 minuten verhitten bij 80°C worden bij muizen na toedienen van het BSE-agens geen symptomen meer aangetroffen. Een vergelijkbaar resultaat wordt gevonden bij pH12. Bij de combinatie pH11 en 80°C daarentegen worden bij alle muizen symptomen waargenomen.

Een vergelijkbaar resultaat wordt waargenomen wanneer de oplossing gedurende een half uur wordt gekookt (100°C). Ook hier geldt dat bij pH12 geen symptomen worden waargenomen, terwijl bij pH11 vijf van de zes muizen symptomen vertonen. Uit de resultaten kan derhalve geconcludeerd worden dat een pH-waarde van 12, of hoger, in combinatie met een temperatuur van minimaal 80°C essentieel is voor volledige inactivatie.

Verhitting in combinatie met natronloog

Naast de combinatie pH en verhitting heeft Somerville gekeken naar de combinatie NaOH en verhitting. De oplossingen werden respectievelijk op 0.01M, 0.1M of 1M NaOH gebracht, waarna de oplossingen bij verschillende temperaturen werden verhit.

Uit de bijgeleverde data blijkt dat een concentratie van 0.01M NaOH ongeacht verhitting niet afdoende is. Op één na vertonen alle muizen na toedienen van het geneutraliseerde agens symptomen. Bij 0.1M NaOH is verhogen van de temperatuur wel effectief. Al vanaf 60°C vindt volledige inactivatie plaats. De door de aanvrager voorgestelde inactivatietemperatuur van 90°C lijkt daarmee afdoende. Echter, opmerkelijk is dat bij een concentratie van 1M NaOH inactivatie vanaf 60°C niet optreedt. Zelfs een verhoging van de temperatuur tot 80°C is niet afdoende. Bij 100°C wordt wel inactivatie gevonden. Dit is in lijn met eerdere bevindingen (13,14).

Mogelijkerwijs dat met het toevoegen van natronloog niet in alle gevallen een pH van 12 of hoger -noodzakelijk voor volledige inactivatie- werd bereikt. Wellicht omdat voor het kweken van muizencellen gebruik gemaakt wordt van gebufferde oplossingen.

Conclusie

De COGEM acht het stellen van vloeibare afval op pH12 of hoger gevolgd door incubatie gedurende 5 uur bij 90°C als procedure voor het inactiveren van prioneiwitten in vloeibaar afval effectief.

De COGEM acht het niet uitgesloten dat bij het op 0.1M NaOH brengen van de oplossing een pH12 of hoger niet bereikt wordt. In verband met de mogelijke aanwezigheid van sterk gebufferde oplossingen. Volledige inactivatie kan hierdoor niet gewaarborgd worden. De COGEM adviseert derhalve om in plaats van de te

inactiveren oplossing op 0.1M NaOH te brengen, deze op minimaal pH12 te stellen voorafgaande aan incubatie gedurende 5 uur bij 90°C.

De COGEM merkt hierbij op dat de door de aanvrager gehanteerde werkwijze waarbij het verzamelen van afval plaatsvindt in inactivatievaten van 40 liter praktische problemen met zich mee kan brengen. Niet alleen de fracties waarin de prioneiwitten zich bevinden, maar de gehele inhoud van het vat zal op een pH-waarde van 12 of hoger gebracht moeten worden alvorens te incuberen bij 90°C.

Daarbij brengt bovengenoemde procedure met zich mee dat besmet afval niet direct wordt vernietigd maar over langere periodes (met een maximum van een week) wordt opgeslagen, waardoor de kans om in aanraking te komen met besmet afval toeneemt.

De voorkeur van de COGEM blijft derhalve, mede gezien het hier kleine hoeveelheden vloeibaar afval (160 ml tot 500 ml per week) betreft én de ernstige gevolgen die een besmetting met het prionagens met zich meebrengt, uitgaan naar de methode zoals deze is aangegeven in haar eerdere adviezen; incuberen in 2M NaOH gevolgd door minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten.

Referenties

- (1) Advisory Committee on Dangerous Pathogens and Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (1998). Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection.
- (2) Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95: 13363-13383.
- (3) Rheede, van, T., Smolemaars, M.M.W., Madsen, O., Jong, de, W.W. (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Molecular Biology and evolution* 20:111-121.
- (4) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- (5) Brown, D.R., Nicholas, R.S. and Canevari, L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of neuroscientific research* 15: 211-224
- (6) Cohen, F.E. en Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annual review of biochemistry* 67: 793-819.
- (7) 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., Madeline, 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.
- (8) 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.
- (9) COGEM-advies CGM/040212-03 (2004). Bovine Spongieuze Encephalopathie/Scrapie; klonering en expressie van PrPgenen afkomstig van varken, rund en schaap in muis.
- (10) COGEM-advies CGM/040526-01 (2004). Inactiveren van Prionen
- (11) COGEM-advies CGM/051028-02. Inactiveren van prionen en huisvesting van met prionen geïnfecteerde transgene muizen
- (12) Race, R.E. (2000). Guest Editorisl. The trouble with Transmissible degenerative Encephalopathy Agents. *The veterinary Journal* 159: 3-4
- (13) Taylor, D.M. (1999). Transmissible degenerative encephalopathies. Inactivation of the causal agents. In *principles and practice of disinfection preservation and sterilisation*, p.222-236.
- (14) Taylor, D.M. (2000). Inactivations of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *The Veterinary Journal*, 159: 10-17