

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
IG 03-189/01.co1

Uw brief van
14 oktober 2005

Kenmerk
CGM/051028-02

Datum
28 oktober 2005

Onderwerp

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende een wijzigingsverzoek van het Centraal Instituut voor Dierziekte Controle te Lelystad op de bestaande vergunning GGO 94-131/2 deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over twee methoden om prionen te inactiveren. In beide gevallen betreft het een incubatie in een chemische oplossing. De eerste methode omvat incubatie gedurende 16 uur in 2 molair natronloog. Bij de tweede methode wordt gedurende 1 uur geïncubeerd in 20.000 ppm natriumhypochloriet.

Bij het inactiveren van prionen dient volgens de COGEM onderscheid gemaakt te worden tussen 1) het desinfecteren van oppervlakken, waaronder werkoppervlakken en instrumenten en 2) het inactiveren van kadavers van met prionen geïnfecteerde transgene muizen en weefsel afkomstig van deze muizen.

De COGEM sluit zich aan bij de richtlijn van de Werkgroep Infectiepreventie. De COGEM acht incubatie gedurende 1 uur (of langer) in 2 molair natronloog uitsluitend adequaat en geschikt voor het desinfecteren van oppervlakken.

De COGEM acht het aannemelijk dat voor het desinfecteren van oppervlakken (werkoppervlakken, instrumenten e.d.) incubatie in 20.000 ppm natriumhypochloriet effectief is. Echter, deze methode heeft gezien een aantal praktische problemen niet haar voorkeur. Voor het inactiveren van prionen in kadavers of weefsels lijkt incubatie in 20.000 ppm natriumhypochloriet minder geschikt en heeft het gebruik van 2 molair natronloog in combinatie met autoclaveren de voorkeur.

Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de huisvesting van met prionen geïnfecteerde transgene muizen. De COGEM acht het niet noodzakelijk om de transgene muizen te huisvesten in filtertopkooien.

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

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

Titel: Inactiveren van prionen en huisvesting van met prionen geïnfecteerde transgene muizen

COGEM advies: CGM/051028-02

Inleiding

Op 13 februari 2004 heeft de COGEM advies (CGM/040212-03) (1) uitgebracht betreffende een wijzigingsverzoek van het Centraal Instituut voor Dierziekte Controle 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 overdraagbare spongieuze encephalopathieën (TSE) zoals Creutzfeld-Jacob Disease (CJD) bij mensen, scrapie bij schapen en Bovine Spongieuze Encephalopathie (BSE) bij runderen.

Voor muizen zijn thans geen prionziekten bekend. Echter het is mogelijk gebleken om muizen te infecteren via experimentele overdracht door intracerebrale toediening of voeding van TSE's (afkomstig van koeien en schapen). Bij de overdracht van de ziekte is sprake van een soort- of speciesbarrière. De ziekte ontwikkelt zich veel langzamer in het geïnfecteerde dier dan in het oorspronkelijke dier waaruit het agens afkomstig is.

Door het gebruik van transgene muizen kan deze soortbarrière worden omzeild waardoor deze dieren als proefmodel gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling van de ziekte te bestuderen. Hiertoe wordt in transgene muizen het PrP gen van rund schaap of varken ingebouwd en de soorteigen PrP-genen uitgeschakeld. Na infectie van deze transgene muizen met TSE's afkomstig van deze landbouwhuisdieren zullen de muizen de bijbehorende prionziekte ontwikkelen.

De COGEM is destijds verzocht een beschouwing te geven met betrekking tot het ontstaan van prionziekten 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 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.

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. Op basis van het COGEM-advies is de voornoemde inactivatiemethode als aanvullend voorschrift opgenomen in de afgegeven beschikking.

Met betrekking tot het huisvesten van transgene muizen heeft de COGEM destijds geadviseerd dat indien de Prp-transgene muizen niet met TSE-preparaten zijn geïnfecteerd deze muizen geen verhoogd risico vormen voor hun omgeving. Deze muizen dienen gehuisvest te worden in een D-I dierverblijf. Voor het werken met transgene muizen in associatie met TSE's acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, indien de voorgenomen experimenten uitgevoerd worden in een DM-II dierverblijf.

Op basis van dit advies moeten de voorgenomen handelingen met transgene Prp-muizen die niet geïnoculeerd zijn met TSE's worden uitgevoerd onder D-I condities. Experimentele infectie van deze transgene muizen met TSE's en huisvesting van geïnfecteerde muizen moeten onder DM-II-condities worden uitgevoerd. De vergunningverlener heeft als aanvullend voorschrift in de beschikking het gebruik van filtertopkooien opgenomen.

Aanvullende adviesvraag mei 2004: inactivatie prionen

De COGEM heeft naar aanleiding van een reactie van de aanvrager richting Bureau GGO, op 26 mei 2004 een aanvullend advies (CGM/040526-00) (2) uitgebrachte met betrekking tot de inactivatie van prionen. In dit advies geeft de COGEM aan dat meerdere methoden als afdoende kunnen worden beschouwd. De COGEM geeft in dit advies aan dat ook de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode van 60 minuten incuberen in 1M NaOH gevolgd door 30 minuten autoclaveren bij 121°C als afdoende kan worden beschouwd evenals 1 minuut koken in 1M NaOH. Wel heeft de COGEM hierbij opgemerkt dat haar voorkeur uitgaat naar de methode zoals aangegeven in haar eerdere advies. De laatstgenoemde methode, incuberen in 2M NaOH gevolgd door een minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten is als aanvullend voorschrift opgenomen in de reeds afgegeven vergunning IG 94-131/02.

Aanvullende adviesvraag oktober 2005: inactivatie prionen en huisvesting van transgene muizen

Inactivatie prionen

De vergunninghouder heeft bij Bureau GGO een tweede wijzigingsverzoek ingediend waarin onder meer wordt aangegeven dat de voorgeschreven inactivatiemethode (2M NaOH gecombineerd met autoclaveren) onpraktisch is voor gebruik in de sectiezalen en dierverblijven. De aanvrager heeft derhalve om toestemming verzocht om drie

ander methoden toe te mogen passen. Deze methoden worden afhankelijk van de werkruimte en de toepassing ingezet. Het betreft de volgende drie methoden:

1. 16 uur incuberen in 1M NaOH gevolgd door 45 minuten autoclavieren bij 121°C;
2. 16 uur incuberen in 1M NaOH;
3. 1 uur incuberen in 20.000 ppm natrium (Na) -hypochloriet (3-5% oplossing).

De COGEM is gevraagd te adviseren over de tweede en derde methode. De eerste methode is stringenter dan in het COGEM advies van 26 mei 2004 en behoeft derhalve geen COGEM-advies.

In het betreffende dossier wordt gesteld dat de genoemde methoden effectief zijn voor zeer stabiele prionstammen met hoge titers. Ter onderbouwing van dit standpunt zijn twee wetenschappelijke publicaties (3,4) bijgevoegd. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat deze inactivatiemethoden als zodanig in de Nederlandse ARBO veiligheidsvoorschriften analoog aan de EU-richtlijnen zijn opgenomen.

Huisvesting muizen

De COGEM is tevens gevraagd te adviseren over de huisvesting van muizen. De aanvrager heeft in zijn wijzigingsverzoek richting Bureau GGO verzocht om transgene muizen geïnfecteerd met TSE's te huisvesten in standaardkooien in het DM-II dierversluit in plaats van in de vergunning voorgeschreven filtertopkooien. Hij voert daarbij de volgende argumenten aan:

- a) Er is geen verhoogd risico voor de medewerkers dat het gebruik van filtertops rechtvaardigt, want:
 1. De *i.c* geïnoculeerde muis is altijd een dead-end-host.
 2. Er wordt geen infectiviteit uitgescheiden door de dieren tijdens de bio-assay (intra cerebrale infectie).
 3. Muizen besmetten elkaar onderling niet. Geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde muizen kunnen daarom naast elkaar gehuisvest worden.
 4. Dierversluiters lopen geen extra risico (geen aerosole besmetting).
 5. Geïnfecteerde conventionele muizen worden al in standaardkooien gehuisvest.
- b) Omdat de muizen op DM-II niveau worden gehouden in kooien is ontsnappen per definitie uitgesloten. Invoering van filtertopkooien ter voorkoming van ontsnapping is derhalve overbodig. Daarbij brengt het gebruik van filtertopkooien onnodig hoge kosten met zich mee en is het gebruik, omdat het klimaat in de kooi nadelig wordt beïnvloed, extra belastend voor de muis.

De COGEM is gevraagd of huisvesting van de geïnfecteerde muizen in standaardkooien in het DM-II dierversluit voldoende bescherming biedt om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

Overwegingen

Inactivatie prionen

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 TSE-agens (3).

In geen van de beschreven experimenten zijn dosisrespons-curves bepaald, waardoor niet met zekerheid gesteld kan worden welke minimale condities tot inactivatie van het TSE-agens leiden. Dit heeft tot gevolg dat niet één methode aangewezen kan worden als zijnde de beste methode. De COGEM is van mening dat praktische overwegingen nooit mogen prevaleren boven de veiligheid van de laboratoriummedewerkers.

De aanvrager heeft aangegeven dat de voorgestelde methode van incuberen in 2M NaOH gevolgd door autoclaveren met name onpraktisch is in sectiezalen en dierverblijven en dat de drie door hem voorgestelde methoden ingezet worden afhankelijk van de werkruimte en de toepassing. De aanvrager heeft hierbij niet vermeld welke praktische bezwaren er bestaan en in hoeverre de door hem voorgestelde methoden deze bezwaren kunnen wegnemen. Eveneens is onduidelijk welke methode de aanvrager voor welke specifieke toepassing in wil zetten. Deze beperkte informatie bemoeilijkt de beoordeling van de voorgestelde methoden. De COGEM beperkt zich derhalve tot het, voor zover mogelijk, opstellen van algemene regels. Zij maakt daarbij onderscheid tussen 1) het desinfecteren van oppervlakken, waaronder werkbladen en instrumenten en 2) het inactiveren van kadavers van met TSE-agens geïnoculeerde transgene muizen en weefsels afkomstig van deze muizen. De COGEM sluit zich aan bij de in januari 2005 gewijzigde richtlijn '*Infectie preventie met betrekking tot infectieziekten*' van de Werkgroep Infectiepreventie (WIP) (5).

Inactivatiemethode 2: 16 uur incuberen in 2 M NaOH

Bij het verzoek tot wijziging van de vergunning wordt ondermeer verwezen naar het artikel van Taylor (3). In dit artikel wordt een algemeen overzicht gegeven van de effectiviteit van methoden die voor inactivatie van TSE's worden toegepast. Taylor presenteert gegevens dat incubatie van TSE-agens met 1M NaOH gedurende 24 uur niet volledig effectief is, evenmin als een behandeling van 2 uur met 2M NaOH. Gegevens waaruit blijkt dat 16 uur incubatie met 2M NaOH als afdoende kunnen worden beschouwd zijn niet in het artikel opgenomen. Wel concludeert de auteur dat incuberen met NaOH niet *per se* effectief is, maar dat met een combinatie van

incubatie in NaOH en autoclaveren inactivatie wel kan worden bereikt. Een vergelijkbare conclusie wordt getrokken in het tweede artikel (4) waarnaar wordt verwezen. Hierin geeft de auteur aan dat combinaties van chemische behandelingen gevolgd door autoclaveren consistente en betrouwbare inactivatiemethoden zijn.

De COGEM acht het, op basis van bovenstaande gegevens, onvoldoende bewezen dat het gebruik van uitsluitend 2M NaOH als procedure voor inactiveren van kadavers van met TSE-agens geïnfecteerde muizen of weefsel als effectief kan worden beschouwd.

In de WIP-richtlijn wordt incubatie gedurende 1 uur in 2M NaOH als een effectieve methode genoemd voor het desinfecteren van instrumenten. Echter de richtlijn meldt hierbij: *‘De effectiviteit is sterk afhankelijk van de voorafgaande reiniging. Dit betekent dat men zich bij toepassing van deze methode ervan moet vergewissen dat de reiniging maximaal is geweest.’* De COGEM sluit zich aan bij deze richtlijn met de nadruk dat het hier gaat om het desinfecteren van instrumenten.

Inactivatiemethode 3: 1 uur incuberen in 20.000 ppm hypochloriet (3-5% oplossing)

Evenals bij de vorige methode wordt ter onderbouwing naar het overzichtsartikel van Taylor verwezen. Het artikel vermeldt dat experimenten hebben aangetoond dat incuberen in 13.750 ppm Na-hypochloriet-oplossing gedurende 30 minuten effectief is en heeft geleid tot de aanbeveling om in de praktijk gedurende 1 uur te incuberen in 20.000 ppm Na-hypochloriet-oplossing. Echter, het artikel van Kimberlin *et al.* (6) waar naar wordt verwezen bevat deze informatie niet. Wel concluderen Kimberlin *et al.* dat de effectiviteit van hoge concentraties hypochloriet suggereert dat het gebruik van hypochloriet voor desinfecteren van oppervlakken toegepast kan worden.

De WIP-richtlijn, de Britse richtlijn *‘TSE-agents; safe working and the prevention of infection* van de ACDP/SEAC Joint TSE Working Group (7) en de richtlijn van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) (8) stellen eveneens dat incuberen in 20.000 ppm Na-hypochloriet gedurende 1 uur effectief is voor het desinfecteren van oppervlakken. De richtlijnen richten zich voornamelijk op het desinfecteren van instrumenten.

Het toepassen van 20.000 ppm hypochloriet stuit echter op een aantal praktische bezwaren. Het gebruik van een dergelijke hoge concentratie Na-hypochlorietoplossing brengt volgens de WIP een dermate groot gevaar voor de ademhalingswegen met zich mee dat gewone persoonlijke beschermingsmiddelen niet afdoende zijn. De WIP schrijft derhalve bij het gebruik van 20.000 ppm Na-hypochloriet het gebruik van gasmaskers voor. Hierbij zij opgemerkt dat de WIP voor het desinfecteren van instrumentarium als standaardmethode de combinatie van desinfectie in 2M NaOH gevolgd door autoclaveren hanteert.

Ook maakt het gebruik van dergelijke hoge concentraties Na-hypochlorietoplossing dat het desinfecteren van werkoppervlakken sterk wordt bemoeilijkt., mede daar het werkoppervlak gedurende 1 uur blootgesteld dient te worden aan de oplossing. De

WIP-richtlijn schrijft voor om werkoppervlakken door middel van celstofmatjes met een ondoordringbare onderlaag te beschermen tegen morsen.

Bij het gebruik van 20.000 ppm Na-hypochlorietoplossing moet, om vorming van chloorgas tijdens het autoclaveren tegen te gaan, voorafgaand aan het autoclaveren het materiaal grondig met water worden afgespoeld. Voor de inactivatie van kadavers van geïnoculeerde transgene muizen of van geïnfecteerd weefsel lijkt incubatie in 20.000 ppm Na-hypochloriet gedurende 1 uur derhalve minder geschikt. Te betwijfelen valt of in de gestelde tijdsduur de Na-hypochlorietoplossing door kan dringen tot alle geïnfecteerde cellen. Hiermee blijft een gereede kans aanwezig dat het spoelwater besmet raakt met TSE's en derhalve eveneens geïnactiveerd moet worden.

Hoewel de COGEM het aannemelijk acht dat voor desinfectie van oppervlakken (o.a. werkoppervlakken en instrumentaria) door incubatie gedurende 1 uur in 20.000 ppm Na-hypochloriet effectief is, heeft deze methode gezien de bovenstaande praktische problemen niet haar voorkeur. Haar voorkeur voor het desinfecteren van instrumentarium gaat uit naar de in de vergunning opgenomen inactivatiemethode van incuberen in 2M NaOH gevolgd door autoclaveren. De COGEM sluit hiermee aan bij de voorschriften zoals deze staan weergegeven in de WIP-richtlijn. Tevens sluit de COGEM zich aan bij de voorschriften van de WIP om werkoppervlakken te voorzien van celstofmatjes met een ondoordringbare onderlaag.

Voor het inactiveren van prionen in kadavers en in weefsel acht de COGEM, gezien het gegeven dat onduidelijk is of inactivatie volledig is én dat autoclaveren op praktische problemen stuit, het gebruik van 20.000 ppm Na-hypochloriet minder geschikt.

Huisvesting muizen

De COGEM is verzocht te adviseren over het huisvesten van met TSE-geïnoculeerde transgene PrPmuizen in standaardkooien in plaats van in de vergunning voorgeschreven filtertopkooien. In het dossier wordt aangegeven dat er geen verhoogd risico voor de medewerkers bestaat dat het gebruik van filtertopkooien rechtvaardigt. Hierbij wordt opgemerkt dat geïnfecteerde muizen geen infectieus agens uitscheiden tijdens de bio-assay en dat muizen elkaar onderling niet kunnen besmetten.

In een zeer recente publicatie (9) tonen onderzoekers aan dat in de urine van met scrapie-geïnfecteerde transgene muizen prionen werden aangetroffen. Injecties van deze urine met prionen in hersenen van gezonde muizen veroorzaakten prionziekte bij de helft van de muizen. Daarbij geven de auteurs aan dat overdracht door urine wellicht een verklaring kan zijn voor de overdracht van TSE's tussen schapen, elanden en herten. Naar aanleiding van dit artikel meldt een priononderzoeker van de University of British Columbia in Vancouver (10) dat het risico om de ziekte op te lopen door het aanraken of binnenkrijgen van urine minuscuul klein is. De transgene muizen waren dusdanig behandeld dat ze een ongewone hoge concentratie prionen in

hun urine uitscheiden en de overdracht vond plaats door injectie in hersenen. De concentratie in geïnfecteerde transgene muizen is doorgaans lager en bij overdracht door opname van urine is een hogere concentratie nodig om infectie te krijgen dan bij het injecteren in hersenen. Daarbij zijn TSE's niet aërogeen overdraagbaar. De kans op overdracht van prionziekten naar overige muizen, laboratoriummedewerkers of dierverzorgers lijkt daarmee zeer klein.

Op basis van de huidige wetenschappelijke gegevens is aëroge overdracht van prionen niet mogelijk. De COGEM acht derhalve het gebruik van filtertopkooien voor het huisvesten van transgene PrPmuizen niet noodzakelijk. Daarbij acht zij het gebruik van alternatieve aanvullende voorschriften bij huisvesting in standaardkooien zoals het dragen van veiligheidsbrillen, neus- en mondkapjes evenmin noodzakelijk.

Conclusie

De COGEM:

- Acht het onvoldoende bewezen dat het gebruik van uitsluitend 2M NaOH als procedure voor het inactiveren van kaders van met TSE-agens geïnfecteerde muizen of weefsel als effectief kan worden beschouwd.
- Sluit zich aan bij de WIP-richtlijn (5) dat incubatie gedurende 1 uur in 2M NaOH een effectieve methode voor het desinfecteren van instrumenten is, mits bij toepassing van deze methode de reiniging vooraf maximaal is geweest.
- Acht het aannemelijk dat voor het desinfecteren van oppervlakken incubatie gedurende 1 uur in 20.000 ppm Na-hypochloriet effectief is. Echter, deze methode heeft gezien een aantal praktische problemen niet haar voorkeur.
- Acht voor het inactiveren van prionen in kadavers en in weefsel het gebruik van 20.000 ppm Na-hypochloriet minder geschikt.
- Beveelt aan om voor het desinfecteren, waar mogelijk, gebruik te maken van de in de vergunning opgenomen inactivatiemethode van incuberen in 2M NaOH gevolgd door autoclaveren. De COGEM sluit hiermee aan bij de WIP-richtlijn.
- Sluit zich bij de WIP-richtlijn aan om werkoppervlakken te voorzien van celstofmatjes met een ondoordringbare onderlaag.
- Acht het niet noodzakelijk om transgene PrPmuizen te huisvesten in filtertopkooien.

Referenties

- (1) COGEM-advies CGM/040212-03 (2004). Bovine Spongieuze Encephalopathie/Scrapie; klonering en expressie van PrPgenen afkomstig van varken, rund en schaap in muis.
- (2) COGEM-advies CGM/040526-01 (2004). Inactiveren van Prionen
- (3) Race RE (2000). Guest Editorisl. The trouble with Transmissible degenerative Encephalopathy Agents. The veterinary Journal 159: 3-4
- (4) Taylor DM (2000). Inactivations of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. The Veterinairy Journal, 159: 10-17
- (5) Richtlijn van de Werkgroep Infectiepreventie (WIP). Infectiepreventie met betrekking tot prionziekten. Vastgesteld mei 2002, gewijzigd januari 2005.
- (6) Kimberlin RH, Walker CA, Millson GC, Taylor DM, Robertson PA, Tomlinson AH, Dickinson AG (1983). Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. Journal of the Neurological Sciences 59(3):355-69.
- (7) Richtlijn van de Britse 'Advisory Committee on Dangerous Pathogens' (2003). Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents: Safe working an the prevention of infection.
- (8) Richtlijnen van de Wereldgezondheidsorganisatie WHO (2000). WHO infection control guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies.
- (9) Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Burkhardt S, Miele G, Aguzzi A (2005). Coincident Scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. Science 310: 324-326
- (10) Bubnoff von A. (2005) Prions foun in urine. Mystery of infections in deer and elk may have solution. News@nature.com published online: 13 october 2005.