

Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks

In May 1999, the Fifty-second World Health Assembly by resolution WHA52.10 authorized temporary retention up to not later than 2002 of the existing stocks of variola virus at the two current locations¹ for the purpose of further international research. The resolution requested the Director-General of WHO to appoint a new group of experts which would establish what research, if any, must be carried out in order to reach global consensus on the timing for the destruction of existing variola virus stocks.

The WHO Advisory Committee on Variola Virus Research, composed of 16 members from all WHO regions and advised by some 10 scientific academic experts from such areas as public health, fundamental applied research and regulatory agencies, was subsequently established and has met 3 times. Reports from the first two meetings have already been submitted to the World Health Assembly.² This article provides a report of the third meeting (Geneva, 3 and 4 December 2001).

Third meeting of the WHO Advisory Committee on Variola Virus Research

The Committee agreed that, despite the considerable progress that had been made in investigating variola virus, significant components of this research, most notably the refinement and use of an animal model developed in 2001 and the development of antiviral drugs, were unlikely to be completed by the end of 2002. Further, during extensive discussion about the potential availability of an animal model, additional research was identified that would necessitate access to live variola virus stocks after the expected 2002 destruction date.

The Committee's main recommendation, therefore, was that serious consideration should be given to further extending the deadline for the destruction of variola virus in order to allow essential research to be completed. Further, this additional research with live variola virus should continue to be carefully monitored and reviewed under the auspices of WHO, and steps should be taken to ensure that all approved research would remain outcome-focused and time-limited and periodically reviewed.

Review of variola virus strains in the two repositories

It was previously noted that the Centers for Disease Control and Prevention held 451 viral isolates obtained from different continents and countries when smallpox was endemic. The current review and the studies reported at the meeting concentrated on some 50 isolates in the Russian collection that were not present in the American collection.

¹ Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, and the Russian State Centre for Research on Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

² See No. 6, 2000, pp. 45-48 and No. 19, 2001, pp. 142-145.

Eradication de la variole: destruction des stocks de virus variolique

En mai 1999, la Cinquante-Deuxième Assemblée mondiale de la Santé a autorisé, par la résolution WHA52.10, le maintien temporaire, jusqu'en 2002 au plus tard, des stocks existants de virus variolique dans les deux sites actuels,¹ aux fins de la poursuite des travaux de recherche internationaux. La résolution a prié également le Directeur général de l'OMS de nommer un nouveau groupe d'experts qui décidera des recherches qui doivent être effectuées, le cas échéant, pour arriver à un consensus mondial sur la date de la destruction des stocks existants de virus variolique.

Le Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique, composé de 16 membres de toutes les régions de l'OMS et conseillé par une dizaine de spécialistes scientifiques de domaines tels que la santé publique, la recherche fondamentale appliquée ou les organismes de réglementation, a ensuite été créé et s'est réuni 3 fois. Les rapports de ses deux premières réunions ont déjà été soumis à l'Assemblée mondiale de la Santé.² Le présent article contient le rapport de la troisième réunion (Genève, 3 et 4 décembre 2001).

Troisième réunion du Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique

Le Comité a décidé que, malgré les progrès considérables de la recherche sur le virus variolique, des éléments importants de ces travaux, et notamment l'amélioration et l'utilisation d'un modèle animal mis au point en 2001 et le développement d'antiviraux, avaient peu de chances d'être achevés avant la fin 2002. En outre, au cours du vaste débat qui a eu lieu sur l'existence potentielle d'un modèle animal, l'opportunité de recherches supplémentaires nécessitant l'accès au virus variolique vivant après la date prévue de destruction des stocks en 2002 a été avancée.

La principale recommandation du Comité a donc été qu'il fallait envisager sérieusement de repousser la date prévue pour la destruction des stocks de virus variolique afin de permettre l'achèvement de l'essentiel des recherches. En outre, ces recherches supplémentaires sur le virus variolique vivant devraient continuer d'être suivies de près et passées en revue sous les auspices de l'OMS, et des mesures devraient être prises pour faire en sorte que toutes les recherches approuvées restent axées sur les résultats et limitées dans le temps et soient périodiquement réexaminées.

Examen des souches de virus variolique dans les deux conservatoires

Il a été noté précédemment que les *Centers for Disease Control and Prevention* détenaient 451 isolements viraux obtenus sur différents continents et dans divers pays lorsque la variole était endémique. L'examen actuel et les études dont il a été rendu compte à la réunion se sont concentrés sur une cinquantaine d'isolements de la collection russe qui ne figuraient pas dans la collection américaine.

¹ *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Géorgie (Etats-Unis d'Amérique) et Centre de recherche de l'état sur la virologie et la biotechnologie, Koltsovo, région de Novosibirsk, Fédération de Russie.

² Voir N° 6, 2000, pp. 45-48 et N° 19, 2001, pp. 142-145.

From these isolates, 23 strains from scab material and previously lyophilized samples were viable in tissue culture. Isolation of DNA from these strains is continuing; already, 2 genomes have been completely cloned and at least 5 others will be cloned by the end of 2002. The Committee agreed that before the end of 2002 further consideration should be given to the necessity of holding the wide range of isolates currently available in the two repositories.

Nucleic acid-based diagnostics

Several methods have been devised recently for very sensitive detection of variola virus DNA and to distinguish this DNA from that of other orthopoxviruses, the most promising being analysis by polymerase chain reaction (PCR) of restriction fragment length polymorphisms, multiplex PCR and real-time PCR with fluorogenic probes. Some of these tests have been used in the definitive diagnosis of a recent laboratory-acquired infection with a non-variola orthopoxvirus.

The results obtained indicate that single-gene restriction fragment length polymorphisms and multiplex PCR detection methods are useful for detecting variola virus in clinical samples. The Committee noted that, although the real-time PCR test has greater sensitivity and can therefore detect infection at an earlier stage, it requires the use of expensive equipment and, so far, cannot consistently distinguish between species of orthopoxviruses. An extended PCR test for restriction fragment length polymorphisms has proved useful in defining the origin of an isolate, but may require prior tissue-culture passage of clinical samples.

The Committee recognized the significant progress made in the area of molecular diagnosis but agreed that there was still scope for improving the sensitivity of the tests available. For example, it would be useful to know how early infection with variola virus might be detected at the prodromal stage. An ultimate goal might be the development of relatively cheap hand-held equipment for the detection of variola virus DNA and diagnosis of infection.

To further this important area of work, the Committee encouraged investigators to share diagnostic reagents, essential primer sequences for PCR assays and protocols where appropriate. This cooperation would be particularly useful for enhancing capabilities in different countries for the rapid and reliable detection and diagnosis of variola virus infections.

Sequence analysis of variola virus DNA

The Committee was informed that the complete genomes of an additional 7 isolates of variola virus had been sequenced, bringing the total number of full-length genome sequences to 10 (9 variola major and 1 variola minor strain). The sequences were highly conserved. To counter the criticism that this result was a consequence of tissue-culture passage, the Committee suggested that further thought be given to sequencing DNA directly from scab material. The known degree of virulence of isolates has not yet been correlated with identified variations in sequences.

The Committee noted that a considerable amount of information on the nucleic acid sequences of variola viruses was

Sur ces isollements, 23 souches provenant de prélèvements effectués au niveau des croûtes cicatricielles et des échantillons lyophilisés étaient viables en culture tissulaire. L'isolement de l'ADN à partir de ces souches se poursuit; 2 génomes ont déjà été entièrement clonés et au moins 5 autres le seront d'ici fin 2002. Le Comité a décidé qu'avant cette date il faudrait envisager la nécessité de conserver toute la gamme des isolements actuellement disponibles dans les deux conservatoires.

Diagnostic reposant sur l'étude de l'ADN

Plusieurs méthodes ont été mises au point récemment qui permettent une détection très sensible de l'ADN du virus variolique et permettent également de distinguer cet ADN de celui des autres orthopoxvirus, la plus prometteuse étant l'analyse par amplification génique (PCR) du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction, la PCR multiplex et la PCR en temps réel au moyen de sondes fluorogéniques. Certains de ces tests ont été utilisés pour le diagnostic de certitude d'une infection récente par un orthopoxvirus non variolique contractée au laboratoire.

Les résultats obtenus montrent que l'analyse par amplification monogénique du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction et la PCR multiplex sont utiles pour détecter le virus variolique dans les échantillons cliniques. Le Comité a constaté que, si la PCR en temps réel était une méthode plus sensible et pouvait donc déceler l'infection à un stade plus précoce, elle nécessitait le recours à un matériel coûteux et, jusqu'ici, ne permettait pas toujours de distinguer les différentes espèces d'orthopoxvirus. Une PCR étendue à l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction s'est révélée utile pour définir l'origine d'un isolement, mais pourrait nécessiter le passage préalable en culture tissulaire des échantillons cliniques.

Le Comité a pris acte des progrès importants accomplis dans le domaine du diagnostic moléculaire, mais a estimé qu'il était encore possible d'améliorer la sensibilité des tests disponibles. Par exemple, il serait utile de savoir comment déceler une infection précoce par le virus variolique au stade prodromique. On pourrait par ailleurs viser en dernier ressort la mise au point d'un matériel portatif manuel relativement bon marché pour déceler l'ADN du virus variolique et diagnostiquer l'infection.

Afin de faire progresser ces travaux importants, le Comité a encouragé les chercheurs à mettre en commun les réactifs de diagnostic, les principales amorces utilisées pour les différentes PCR et les protocoles d'étude le cas échéant. Cette coopération serait particulièrement utile pour renforcer les capacités des différents pays en matière de détection et de diagnostic rapides et fiables de l'infection par le virus variolique.

Séquencage de l'ADN du virus variolique

Le Comité a été informé que les génomes complets de 7 isolements supplémentaires du virus variolique avaient été séquencés, ce qui porte le nombre total de séquences génomiques complètes à 10 (9 souches de variole majeure et 1 souche de variole mineure). Les séquences ont été très bien conservées. Pour répondre aux critiques arguant que ce résultat était la conséquence d'un passage en culture tissulaire, le Comité a suggéré de réfléchir plus avant au séquençage de l'ADN directement à partir des croûtes. Le degré connu de virulence des isolements n'a pas encore été corrélé avec les variations observées dans les séquences.

Le Comité a constaté qu'un volume considérable d'informations sur les séquences de l'ADN des virus varioliques était désormais

now available. After discussion, it was agreed that further sequencing of the more variable genomic termini had priority over the derivation of sequences of additional whole genomes. This would be useful for forensic purposes if there were ever a deliberate release of variola viruses, and reference DNA should be kept for this purpose.

Serological assays

Polyclonal and monoclonal antibodies against vaccinia virus have been used in various enzyme-linked immunosorbent assays to evaluate their usefulness in the detection of variola virus antigens. Polyclonal antibodies detected all viral strains more readily than the monoclonal antibodies currently available, but, although the methods appear to be relatively sensitive, they do not facilitate the detection of all viral isolates. The Committee concluded that a variola virus-specific serological assay could usefully complement molecular diagnostic techniques, particularly as a second method to detect infection. However, further validation of the tests available was needed.

Animal models

The Committee was informed of the successful infection of cynomolgus monkeys with 2 different variola virus strains by intravenous, or intravenous plus aerosol, routes. The disease induced shared several pathological features with human smallpox but the course of disease is much faster and the dose of virus needed to cause intravenous infection is particularly high.

Additional studies are needed to improve and validate this animal model, but this would need work extending beyond 2002. The monkey model has the potential to be used as an assay in prophylactic or therapeutic studies with live variola virus and could also provide access to good diagnostic reagents. Other surrogate animal models are being investigated in parallel, in particular the infection of monkeys with monkeypox virus and the infection of rodents with cowpox virus, in order to obtain data that relate more to models using variola virus.

Drug development

Most studies have focused so far on the efficacy of cidofovir against poxviruses. This compound has demonstrable activity against cowpox in mice and against monkeypox in monkeys. In the United States of America, cidofovir may be used in emergencies as an investigational new drug to treat significant adverse events following immunization with the current smallpox vaccine, and in the unlikely event of smallpox re-emerging.

In vitro screening of other chemical entities has identified more than 140 additional compounds with antiviral activity against poxviruses. The finding that some of these compounds have selective activity, inhibiting one or more orthopoxviruses but not necessarily variola virus, supports the premise that access to live variola virus is necessary for the effective screening of additional lead compounds. Most active compounds identified so far target the viral DNA polymerase and it was considered important to identify other viral gene products susceptible to drug intervention.

disponible. Après discussion, il a été convenu que la poursuite du séquençage des extrémités plus variables du génome primait l'obtention de séquences d'autres génomes entiers. Ce serait utile aux fins d'expertise médico-légale en cas de propagation délibérée des virus varioliques, et il faudrait conserver à cette fin de l'ADN de référence.

Epreuves sérologiques

Des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre le virus de la vaccine ont été utilisés dans divers titrages immunoenzymatiques afin d'en évaluer l'utilité pour la détection des antigènes varioliques. Les anticorps polyclonaux permettent de déceler toutes les souches virales plus facilement que les anticorps monoclonaux actuellement disponibles, mais, si ces méthodes semblent relativement sensibles, elles ne rendent pas facile la détection de tous les isolements viraux. Le Comité a conclu qu'une épreuve sérologique propre au virus variolique pourrait compléter utilement les techniques de diagnostic moléculaire, en particulier comme seconde méthode de détection. Les tests disponibles doivent néanmoins être plus largement validés.

Modèles animaux

Le Comité a été informé du succès de l'infection de macaques cynomolgus au moyen de 2 souches différentes de virus variolique injectées par voie intraveineuse, ou par voie intraveineuse et aérosol. La maladie provoquée a en commun plusieurs signes pathologiques avec la variole humaine, mais l'évolution est beaucoup plus rapide et la dose de virus nécessaire pour entraîner l'infection par voie intraveineuse est particulièrement élevée.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour améliorer et valider ce modèle animal, mais les travaux devraient s'étendre au-delà de 2002. Ce modèle simien pourrait être utilisé à titre expérimental dans le cadre d'études prophylactiques ou thérapeutiques avec le virus variolique vivant et pourrait également permettre de mettre au point de bons réactifs de diagnostic. Parallèlement, on recherche également d'autres modèles animaux, en particulier en infectant des singes avec le virus de l'orthopoxvirose simienne et des rongeurs avec le virus de la variole bovine, afin d'obtenir des données plus en rapport avec les modèles utilisant le virus variolique.

Mise au point de médicaments

La plupart des études ont jusqu'ici porté principalement sur l'efficacité du cidofovir contre les poxvirus. Ce composé possède une activité démontrable contre la variole bovine chez la souris et contre l'orthopoxvirose simienne chez le singe. Aux Etats-Unis d'Amérique, le cidofovir peut être utilisé en situation d'urgence comme nouveau médicament expérimental pour traiter des manifestations postvaccinales indésirables importantes survenant avec l'actuel vaccin antivariolique, et dans l'éventualité improbable d'une réémergence de la variole.

Le dépistage *in vitro* d'autres entités chimiques a permis d'identifier plus de 140 autres composés ayant une activité antivirale dirigée contre les poxvirus. On a découvert que certains d'entre eux avaient une activité sélective, inhibant un ou plusieurs orthopoxvirus, mais pas nécessairement le virus variolique, ce qui vient encore renforcer le postulat selon lequel il faut avoir accès au virus variolique vivant pour pouvoir cibler efficacement d'autres composés chefs de file. La plupart des composés actifs identifiés jusqu'ici visent l'ADN-polymérase virale et l'on considère qu'il est important d'identifier d'autres produits géniques viraux pouvant se prêter à une intervention pharmacologique.

Vaccine development

The Committee agreed that the best safeguard against smallpox was vaccination. This strategy had been successfully deployed during the eradication programme, but the smallpox vaccine currently available was associated with a significant number of adverse events. This suggested that, although the current vaccine had proved its efficacy and utility, improvements were needed, particularly to facilitate the safe and effective immunization of vulnerable sectors of certain populations (the immunocompromised, the elderly, pregnant women and children with eczema).

The Committee therefore encouraged the delineation of further research into vaccine strategies that might use more attenuated vaccinia virus strains, subunit vaccines or other promising approaches, including DNA vaccines. Results reported at the meeting and in numerous publications on attenuated vaccinia virus recombinants encoding antigens from other pathogens indicate the potential value of these alternative strategies for vaccine development. It was recognized that access to live variola virus would be necessary to assess the efficacy of new, improved smallpox vaccines and, ultimately, to obtain regulatory approval.

Conclusions and recommendations

The Committee acknowledged that important progress has been made in health-oriented research involving variola virus. However, it concluded that much essential research will not be completed by the end of 2002. The Committee recommended that further goal-oriented research, extending beyond the expected 2002 destruction deadline, could be justified so that the world population could be adequately prepared for the unlikely, but potentially catastrophic, event of a re-emergence of smallpox.

It was further recommended that the current advisory committee should continue its role in monitoring and reviewing all research involving live variola virus, and that steps should be taken to ensure that all approved research would remain outcome-focused and time-limited.

Recommendations of the Director-General

Having noted the report of the Advisory Committee for Variola Virus Research, including the recommendations for research priorities, and its conclusion that the research programme will not be completed by the end of 2002, the Director-General recommended that:

- the WHO Advisory Committee on Variola Virus Research should continue to oversee the variola virus research programme, and that the research programme should be conducted in an open and transparent manner;
- the research programme should be completed as quickly as possible, and a proposed new date for destruction should be set when the research accomplishments and outcomes allows consensus to be reached on the timing of destruction of variola virus stocks;
- regular biosafety inspections of the storage and research facilities should be continued in order to confirm the strict containment of existing stocks and to ensure a safe research environment for work with variola virus;

Mise au point d'un vaccin

Le Comité a décidé que la meilleure protection contre la variole était la vaccination. Cette stratégie a été mise en œuvre avec succès pendant le programme d'éradication, mais un nombre important de réactions indésirables est associé au vaccin antivariolique actuellement disponible. Aussi, si le vaccin actuel a fait la preuve de son efficacité et de son utilité, des améliorations seraient nécessaires, en particulier pour faciliter une vaccination sûre et efficace des groupes vulnérables de la population (les personnes immunodéprimées, les personnes âgées, les femmes enceintes et les enfants souffrant d'eczéma).

Le Comité a donc encouragé la définition de nouvelles recherches sur les stratégies vaccinales susceptibles d'utiliser des souches du virus de la vaccine plus atténuées, des vaccins sous-unités ou autres approches prometteuses, y compris les vaccins à ADN. Les résultats dont il a été rendu compte à la réunion et dans de nombreuses publications sur des virus de la vaccine atténués recombinés codant pour des antigènes d'autres germes pathogènes montrent l'intérêt potentiel de ces autres stratégies pour la mise au point d'un vaccin. Il a été reconnu que l'accès au virus variolique vivant serait nécessaire pour évaluer l'efficacité des nouveaux vaccins améliorés contre la variole et obtenir à terme leur homologation.

Conclusions et recommandations

Le Comité a reconnu que des progrès importants avaient été faits dans la recherche médicale sur le virus variolique. Toutefois il a conclu que beaucoup de travaux de recherche fondamentale ne seront pas achevés avant fin 2002. Il a donc estimé que de plus amples recherches finalisées, s'étendant au-delà de la date de destruction prévue de 2002, se justifiaient pour que la population mondiale puisse être convenablement préparée dans l'éventualité, improbable mais potentiellement catastrophique, d'une réémergence de la variole.

Il a en outre été recommandé que le Comité consultatif actuel poursuive son travail de surveillance et d'examen de tous les travaux de recherche portant sur le virus variolique vivant et que des mesures soient prises pour faire en sorte que toutes les recherches approuvées restent orientées sur des résultats et limitées dans le temps.

Recommandations du directeur général

Ayant pris note du rapport du Comité consultatif de la recherche sur le virus variolique, et notamment des recommandations concernant les priorités de la recherche, et de sa conclusion, à savoir que le programme de recherche ne sera pas achevé avant fin 2002, le Directeur général recommande:

- que le Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique continue de contrôler le programme de recherche sur le virus variolique et que le programme de recherche soit exécuté de façon ouverte et transparente;
- que le programme de recherche soit achevé aussi rapidement que possible et qu'une nouvelle date de destruction proposée soit fixée lorsque les réalisations et les résultats de la recherche permettront d'atteindre un consensus sur la date de destruction des stocks de virus variolique;
- que des inspections régulières portant sur la sécurité biologique des installations de stockage et de recherche soient poursuivies afin de confirmer que les stocks existants sont soumis à un confinement strict et d'assurer un environnement sans danger pour les chercheurs travaillant sur le virus de la variole;

-
- depending on progress, a report on the research should be submitted to the Executive Board and World Health Assembly in 2-3 years' time. ■

- selon les progrès accomplis, qu'un rapport sur les recherches en cours soit soumis au Conseil exécutif et à l'Assemblée mondiale de la Santé dans 2 ou 3 ans. ■
-