

Smallpox eradication: temporary retention of variola virus stocks

In May 1999 the World Health Assembly by resolution WHA52.10 authorized temporary retention up to, but not later than, 2002 of the existing stocks of variola virus at the current locations,¹ for the purpose of further international research. The Assembly requested the Director-General to appoint a new group of experts to establish what research, if any, must be carried out in order to obtain consensus on the timing for the destruction of the existing variola virus stocks.

In accordance with this resolution, a new group of experts was appointed; this WHO Advisory Committee on Variola Virus Research is composed of 16 members from all WHO regions. At its first meeting (Geneva, 6-9 December 1999), attended also by 10 advisers from fundamental applied research and regulatory agencies, the Committee agreed that a scientific subcommittee be established for the purpose of overseeing future research on variola virus, with members of this subcommittee to be drawn from the Advisory Committee on Variola Virus Research.

Meeting of the WHO Advisory Committee on Variola Virus Research (Geneva, 15-16 February 2001)

The main aims of the meeting were:

- to review progress on the agreed programmes of research on variola viruses;

¹ WHO Collaborating Centre for Smallpox and Other Poxvirus Infections, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America; WHO Collaborating Centre for Orthopoxvirus Diagnosis and Repository for Variola Virus Strains and DNA, State Research Centre of Virology and Biotechnology "VECTOR", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Eradication de la variole: maintien temporaire des stocks de virus variolique

En mai 1999, l'Assemblée mondiale de la Santé a décidé, dans sa résolution WHA52.10, d'autoriser le maintien temporaire, mais au plus tard jusqu'en 2002, des stocks existants de virus variolique dans les sites actuels¹ pour permettre la poursuite des travaux de recherche internationaux. L'Assemblée a prié le Directeur général de nommer un nouveau groupe d'experts chargé de décider des recherches à effectuer, le cas échéant, pour parvenir à un consensus sur la date de destruction des stocks existants de virus variolique.

Conformément à cette résolution, un nouveau groupe d'experts – le Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique – composé de 16 membres de différents pays représentant toutes les régions de l'OMS, a été désigné. A sa première réunion (Genève, 6-9 décembre 1999), à laquelle ont également assisté 10 conseillers représentant des instituts de recherche fondamentale et appliquée et des organismes de réglementation, le Comité est convenu de la nécessité d'établir un sous-comité scientifique chargé de superviser la recherche future sur le virus variolique, et dont les membres feraient partie du Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique.

Réunion du Comité consultatif OMS de la recherche sur le virus variolique (Genève, 15-16 février 2001)

La réunion avait pour buts principaux:

- d'examiner l'état d'avancement des programmes agréés de recherche sur les virus varioliques;

¹ Centre collaborateur de l'OMS pour la variole et les autres orthopoxviroses, *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Géorgie, Etats-Unis d'Amérique; centre collaborateur de l'OMS pour le diagnostic des orthopoxviroses et Conservatoire des souches et de l'ADN du virus variolique; Centre de recherche de l'état sur la virologie et la biotechnologie «VECTOR», Koltsovo, région de Novosibirsk, Fédération de Russie.

- to determine whether this progress was sufficient to accommodate the planned destruction date in 2002;
- to identify any significant gaps in the present research programme; and
- to advise, as appropriate, on other possible directions of research.

The Committee concluded that considerable progress had been made in several areas of research on variola virus: state of strain collections and viability of viral isolates, phylogenetic analysis, detection and differentiation of orthopoxvirus DNA, nucleotide sequence analysis of variola virus DNA, serological detection of variola virus, antiviral agents and animal models of smallpox.

State of strain collections and viability of viral isolates

The Centers for Disease Control and Prevention hold 451 viral isolates derived from several different national collections. Most are isolates of variola virus and a database has been created to link them with available diagnostic and epidemiological data. Of 49 strains, selected on the basis of geography, year of isolation and low passage history, that have been further analysed, 45 were shown to be viable. These isolates came from Asia (21), Africa (16), Europe (5), South America (2) and North America (1). Many showed uniform plaque morphology and grew to high titre in tissue culture. Of the 45 viable isolates, 37 came from *in vitro* cultured material and the remainder from scab (non-passaged) samples.

The samples currently held at the Russian Centre, VECTOR, began to be collected in Moscow in the mid-1950s. The collection was augmented with isolates obtained by the then WHO collaborating centre on smallpox in Moscow during the diagnostic studies that supported the smallpox eradication programme. The present collection includes primary material (scabs), frozen liquid cultures and lyophilized samples. Not all samples have been tested for viability; 5 primary scab isolates, 4 of 9 frozen cultures and all 6 lyophilized strains have demonstrable viability.

Cooperation between staff at the 2 collaborating centres has begun, in order to ensure that any future work on viral characterization, including the transfer of reagents, is adequately coordinated.

The Committee concluded that additional work may be needed to assess the viability of the stocks held in VECTOR, and that further molecular characterization of additional strains may be valuable in helping to identify strains from which further DNA sequences could be determined.

Phylogenetic analysis with DNA amplification technologies

Several techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) to facilitate the characterization and phylogenetic analysis of variola virus isolates were described. These included restriction fragment length polymorphism of PCR products amplified with a variety of primers, and multiplex PCR analysis. As a general rule, primers complementary to

- de déterminer si les progrès réalisés sont suffisants pour que la date prévue de destruction des stocks en 2002 soit respectée;
- d'identifier toute lacune significative du programme actuel de recherche; et
- de conseiller, le cas échéant, d'autres orientations possibles de recherche.

Le Comité a conclu que des progrès considérables avaient été réalisés dans plusieurs domaines de la recherche sur le virus variolique: état des collections de souches et viabilité des isolats viraux, analyse phylogénétique, détection et différenciation de l'ADN d'orthopoxvirus, analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN du virus variolique, détection sérologique du virus variolique, médicaments antiviraux et modèles animaux.

Etat des collections de souches et viabilité des isolats viraux

Les *Centers for Disease Control and Prevention* détiennent 451 isolats viraux dérivés de différentes collections nationales. La plupart sont des isolats de virus variolique et une base de données a été créée afin de les relier aux données diagnostiques et épidémiologiques disponibles. Sur 49 souches soumises à une analyse plus poussée et choisies en fonction de leur origine géographique, de leur année d'isolement et de leur faible nombre de passages, 45 ont été trouvées viables. Ces isolats provenaient d'Asie (21), d'Afrique (16), d'Europe (5), d'Amérique du Sud (2) et d'Amérique du Nord (1). Nombre d'entre eux présentaient une morphologie des plages uniforme et atteignaient un titre élevé en culture tissulaire. Sur les 45 isolats viables, 37 provenaient d'un matériel cultivé *in vitro* et les autres de prélèvements de croûtes cicatricielles n'ayant subi aucun passage.

Les échantillons actuellement détenus au Centre russe VECTOR ont commencé à être rassemblés à Moscou vers le milieu des années 50. Cette collection a été complétée par des isolats obtenus, au cours des études diagnostiques réalisées dans le cadre du programme d'éradication de la variole, par le laboratoire qui était à l'époque le centre collaborateur de l'OMS pour la variole à Moscou. La collection actuelle comprend du matériel primaire (croûtes cicatricielles), des cultures conservées à l'état congelé et des échantillons lyophilisés. Tous les échantillons n'ont pas fait l'objet d'une épreuve de viabilité; 5 isolats primaires, 4 des 9 cultures congelées et l'ensemble des 6 souches lyophilisées présentent une viabilité démontrable.

Une coopération entre le personnel des 2 centres collaborateurs a débuté dans le but d'assurer une coordination convenable de tous les travaux futurs sur la caractérisation du virus, y compris le transfert des réactifs.

Le Comité a conclu qu'il pouvait être nécessaire d'entreprendre des travaux supplémentaires pour évaluer la viabilité des stocks détenus au Centre VECTOR, et qu'une caractérisation moléculaire plus poussée de nouvelles souches pouvait être utile pour aider à identifier les souches pour lesquelles de nouvelles séquences d'ADN pourraient être déterminées.

Analyse phylogénétique au moyen de technologies d'amplification de l'ADN

Plusieurs techniques basées sur l'amplification génique (PCR) pour faciliter la caractérisation et l'analyse phylogénétique des isolats de virus variolique ont été décrites. Il s'agit du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des produits de la PCR amplifiés au moyen de diverses amorces, et de l'analyse PCR multiplex. En règle générale, on a utilisé des amorces complémentaires

sequences in the central conserved genomic region were used for the comparison of all orthopoxviruses whereas those complementary to sequences located towards the genomic termini were used to provide species- and strain-specific data. The Committee concluded that significant progress had been made in applying PCR technology to the investigation of phylogenetic relationships between the orthopoxviruses, particularly variola viruses.

Detection and differentiation of orthopoxvirus DNA

Several methods using DNA amplification technologies were described for the detection and subsequent diagnosis of orthopoxvirus infections. A major objective of this work is the real-time identification of smallpox viruses. The basic procedures used are similar to those already described for phylogenetic analysis of different variola virus isolates. The detection and differentiation of orthopoxvirus strains and individual strains of variola virus generally involve the generation of PCR-amplified products from both conserved and variable regions of the genome. Different groups have developed different platforms for the process of detecting amplified DNA products.

The Committee noted the enormous progress in this area. Although a major limitation to these procedures was the methods used to obtain the initial DNA samples, some reliable and rapid procedures with commercially available reagents are becoming available. The Committee also noted that the specificity of the procedures completely depended on the sequences of the primers used for amplification. The detection of nucleotide sequences in cowpox virus that were previously considered to be specific to variola virus, emphasized the point that the use of a single locus for PCR amplification is insufficient to provide unambiguous identification. Members of the Committee questioned the need for rapid analytical procedures that were sufficiently sensitive to differentiate between variola subspecies when the clinical management of infected individuals would be the same. It was recognized that the ability to detect the presence or absence of any orthopoxvirus in real time would be needed in emergency public health situations.

Nucleotide sequence analysis of variola virus DNA

The Committee was informed that the nucleotide sequences of 3 complete variola virus genomes were now available. Substantial parts of the genomes of 3 other variola virus strains – Congo 70, Somalia 77 and India 7124 – had also been determined. The full sequence of camelpox virus, the closest known relative of variola virus, was described. Many sequence data are also available for individual genes of various other orthopoxviruses.

The data obtained so far have confirmed the suspected evolutionary relationships between orthopoxviruses and have facilitated the further classification of different variola isolates into subspecies. At least 6 complete variola virus genome sequences should be available by the end of 2002. It may also be possible to obtain sequence information from scab material that has not been passaged *in vitro*. The Committee concluded that very good progress had been made in analysing the sequences of smallpox virus genomes.

des séquences de la région centrale conservée du génome pour comparer l'ensemble des orthopoxvirus et des amorces complémentaires des séquences situées vers les parties terminales du génome pour obtenir des données spécifiques d'espèce et de souche. Le Comité a conclu que des progrès notables avaient été réalisés lors de l'application de la technologie PCR à l'investigation des relations phylogénétiques entre orthopoxvirus, en particulier entre virus varioliques.

Détection et différenciation de l'ADN d'orthopoxvirus

Plusieurs méthodes faisant appel aux technologies d'amplification de l'ADN ont été décrites pour la détection et le diagnostic ultérieur des infections à orthopoxvirus. L'un des objectifs majeurs de ces travaux est l'identification des virus varioliques en temps réel. Les procédures de base sont similaires à celles déjà décrites pour l'analyse phylogénétique des différents isolats de virus variolique. La détection et la différenciation des souches d'orthopoxvirus et des souches individuelles de virus variolique comportent généralement l'obtention de produits amplifiés par PCR à partir des régions conservées et variables du génome. Différents groupes ont élaboré des plates-formes pour les procédures de détection de l'ADN amplifié.

Le Comité a pris note des progrès énormes réalisés dans ce domaine. Bien que ces procédures soient considérablement limitées par les méthodes utilisées à l'origine pour obtenir les échantillons d'ADN, des procédures fiables et rapides faisant appel à des réactifs du commerce deviennent maintenant utilisables. Le Comité a également noté que la spécificité des procédures dépendait entièrement de la séquence des amorces utilisées pour l'amplification. La détection, dans le virus du cowpox (variole bovine), de séquences nucléotidiques auparavant considérées comme spécifiques du virus variolique montre clairement que l'utilisation d'un locus unique pour l'amplification génique par PCR ne suffit pas à permettre une identification formelle. Les membres du Comité se sont interrogés sur la nécessité de procédures d'analyse rapides suffisamment sensibles pour permettre de distinguer les sous-espèces de virus variolique, alors que la prise en charge clinique des sujets infectés est la même. Il a été convenu que l'aptitude à détecter en temps réel la présence ou l'absence d'un orthopoxvirus quel qu'il soit serait nécessaire en cas de situation d'urgence sanitaire.

Analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN du virus variolique

Le Comité a été informé que les séquences nucléotidiques de 3 génomes complets de virus variolique étaient maintenant disponibles. Des parties importantes du génome de 3 autres souches de virus variolique – Congo 70, Somalia 77 et India 7124 – ont également été déterminées. La séquence complète du virus du camelpox (variole du chameau), le plus étroitement apparenté au virus variolique que l'on connaisse, a été décrite. Il existe également de nombreuses données sur la séquence de gènes individuels de divers autres orthopoxvirus.

Les données obtenues jusqu'à présent ont confirmé les relations entre orthopoxvirus que l'on suppose liées à l'évolution et ont facilité la classification plus poussée de différents isolats de virus de la variole en sous-espèces. Au moins 6 séquences complètes du génome du virus variolique devraient être disponibles d'ici fin 2002. Il se peut également que l'on obtienne des informations sur la séquence du virus à partir de matériel provenant de croûtes cicatricielles et n'ayant pas fait l'objet de passages *in vitro*. Le Comité a conclu que de très importants progrès avaient été réalisés dans l'analyse des séquences du génome des virus varioliques.

Serological detection of variola virus

Work using monoclonal and polyclonal antibodies against vaccinia virus proteins in enzyme-linked immunosorbent assays to detect orthopoxviruses was described. With these reagents, such tests can detect various orthopoxviruses, including camelpox, cowpox, monkeypox, vaccinia and variola viruses. The relative sensitivity for detecting the different viruses varied, and strain differentiation was not possible with this method. Work is in progress to determine whether tests using these reagents can differentiate live variola major and minor strains.

The Committee concluded that much useful work was being done in this area and that it would be important for any generated monoclonal antibodies to be thoroughly characterized with respect to the variola proteins against which they react.

Antiviral agents

Cidofovir inhibits a wide variety of DNA viruses including orthopoxviruses. Its mechanism of action is through selective inhibition of the viral DNA polymerase. *In vitro* tests for antiviral activity show that cidofovir inhibits both vaccinia and 35 different isolates of variola virus. Each isolate had similar sensitivity to the drug and induction of resistance mutations does not appear to be a problem. Other orthopoxviruses could therefore be developed as surrogate models for antiviral drug testing after variola virus stocks have been destroyed. The Committee noted that considerable progress had been made.

Animal models of smallpox

Most work has been done on the aerosol infection of cynomolgus monkeys with the Yamada and Lee strains of variola virus. Clinical signs appear in infected animals by 6 days after infection. Clinical disease is apparent and the animals seroconvert but there is no mortality. The Committee concluded that this model was not suitable for assessing the efficacy of new vaccines or drugs. Further work is expected to be done with different strains of variola virus and different primate species, including a possible collaborative project with scientists at VECTOR using baboons as the animal model.

The Committee concluded that progress was satisfactory but that the rate was slow. It noted the proposed work on the infection of baboons but indicated that additional work may be required to identify and characterize further surrogate models in comparison to those of variola virus infection so that a validated system for drug and vaccine assessments can be established. ■

Détection sérologique du virus variolique

Des travaux faisant appel à des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre des protéines de virus de la vaccine, utilisés dans des tests immuno-enzymatiques de détection des orthopoxvirus, ont été décrits. À l'aide de ces réactifs, ce type de tests peut détecter divers orthopoxvirus, dont ceux du camelpox, du cowpox, du monkeypox, de la vaccine et de la variole. Ces tests détectaient les différents virus avec une sensibilité relative variable et ne permettaient pas de différencier les souches. Des travaux sont en cours afin de déterminer si des tests utilisant ces mêmes réactifs peuvent distinguer des souches vivantes de variole mineure et majeure.

Le Comité a conclu qu'un grand nombre de travaux utiles étaient en cours dans ce domaine et qu'il serait utile de caractériser entièrement tout anticorps monoclonal produit par rapport aux protéines du virus variolique contre lesquelles ils réagissent.

Médicaments antiviraux

Le cidofovir inhibe une grande variété de virus à ADN, dont les orthopoxvirus. Il agit par inhibition sélective de l'ADN-polymerase virale. Des tests *in vitro* de recherche de l'activité antivirale montrent que le cidofovir inhibe à la fois le virus de la vaccine et 35 isolats différents de virus variolique. Tous les isolats ont une sensibilité similaire au médicament et l'induction de mutations conduisant à la résistance ne semble pas poser de problème. D'autres orthopoxvirus pourraient donc être mis au point en tant que modèles de remplacement pour les essais d'antiviraux après la destruction des stocks de virus variolique. Le Comité a noté que des progrès considérables avaient été réalisés dans ce domaine.

Modèles animaux

La plupart des travaux ont été réalisés sur l'infection du singe cynomolgus par aérosol au moyen des souches Yamada et Lee de virus variolique. Les signes cliniques apparaissent chez les animaux infectés dans les 6 jours suivant l'inoculation. La maladie clinique se déclare et les animaux font une séroconversion mais ne meurent pas. Le Comité a conclu que ce modèle ne convenait pas à l'évaluation de l'efficacité de nouveaux vaccins ou médicaments. De nouveaux travaux devraient être réalisés avec différentes souches de virus variolique et différentes espèces de primates, éventuellement dans le cadre d'un projet en collaboration avec les scientifiques du Centre VECTOR portant sur l'utilisation du babouin comme modèle animal.

Le Comité a conclu que les progrès réalisés étaient satisfaisants mais qu'ils étaient lents. Il a pris note des travaux proposés sur l'infection du babouin, mais a indiqué que des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour identifier et caractériser d'autres modèles de remplacement par rapport au modèle d'infection par le virus variolique de façon à pouvoir établir un système validé d'évaluation des médicaments et vaccins. ■