

Aan de Minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 13 maart 2008  
**KENMERK** CGM/080313-05  
**ONDERWERP** Werkzaamheden met *Rift Valley fever virus*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel "Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus* (RVFV)" van de Animal Sciences Group van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de ontwikkeling van een vaccin tegen het *Rift Valley fever virus* (RVFV). Het virus behoort tot de familie van de *Bunyaviridae* en het virusgenoom bestaat uit drie genoomsegmenten.

Het virus is infectieus voor mens en dier en beiden kunnen aan een infectie met het virus overlijden. Het virus wordt onder andere overgedragen door muggen en via bloedcontact. Ook verspreiding via aërosolen die bijvoorbeeld vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren is mogelijk. Verspreiding van mens op mens is tot op heden niet aangetoond.

Voor de ontwikkeling van het vaccin wil de aanvrager het volledige RVFV en afgeleide mutanten hiervan produceren in dierlijke cellen en dit vervolgens inspuiten in kleine knaagdieren om de werking van het vaccin te kunnen testen. Daarna wil de aanvrager de cellen en weefsels van deze ratten bestuderen. De COGEM is van mening dat het RVFV als klasse 3 pathogeen geclassificeerd moet worden en dat handelingen met vol-virulent RVFV of mutanten hiervan in combinatie met cellen of weefsels daarmee op ML-III niveau uitgevoerd dienen te worden. Voor de dierexperimenten adviseert de COGEM een DM-III niveau.

Daarnaast wil de aanvrager afzonderlijke genoomsegmenten produceren waarbij hij aangeeft dat slechts twee van de drie volledige of onvolledige genoomsegmenten tegelijkertijd zullen worden geproduceerd. Door het ontbreken van een volledig genoom kunnen geen autonoom replicerende infectieuze virusdeeltjes gevormd worden. Bovendien is de kans op complementatie verwaarloosbaar klein door de afwezigheid van RVFV en andere Bunyavirussen in de te transfecteren cellen. Indien aan deze voorwaarden is voldaan, is de COGEM van mening dat uitvoering van deze experimenten op ML-II niveau, verwaarloosbaar kleine risico's met zich meebrengt.

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, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf  
Dr. I. van der Leij

# **Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVFV)**

## **COGEM advies CGM/080313-05**

### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de ontwikkeling van een vaccin tegen het *Rift Valley fever virus* (RVFV). Het RVFV is voor het eerst geïdentificeerd in 1931 tijdens de inspectie van een epidemie onder schapen in de Rift vallei in Kenia. Inmiddels is bekend dat het virus endemisch is in verschillende Afrikaanse landen. In 2000 heeft het virus zich ook in Azië gemanifesteerd (Saoedi-Arabië en Yemen) (1).

Het virus is primair infectieus voor landbouwdieren waaronder schapen, geiten, koeien en kamelen, maar ook andere dieren zoals enkele knaagdieren, apen en vogels zijn gevoelig voor het virus. Naast dieren kan het virus ook mensen infecteren. In Kenia heeft in 1997-98 tot nu toe de grootste uitbraak plaatsgevonden waarbij naar schatting 89.000 personen geïnfecteerd raakten en 478 mensen overleden (5). Over het algemeen overlijdt minder dan 1% van de geïnfecteerde personen aan een infectie. Bij dieren ligt dit percentage hoger afhankelijk van verschillende factoren waaronder de susceptibiliteit van de gastheer en de leeftijd waarop de dieren geïnfecteerd raken.

De aanvrager geeft aan dat er voor dit virus geen humaan vaccin op de markt beschikbaar is, ook zijn er geen effectieve antivirale middelen bekend. Er bestaan wel veterinaire vaccins. Er is een verzwakt levend vaccin aanwezig voor veterinaire toediening, het zogenaamde Smithburn vaccin. Dit vaccin veroorzaakt echter bij dieren vroeg in de dracht abortussen en er is eveneens reversie naar virulentie waargenomen. Het gebruik van dit vaccin is in Europa verboden omdat bovendien het risico bestaat dat met levende vaccins reassortments met wildtype virussen kunnen optreden. Daarnaast bestaat er een geïnactiveerd vaccin, dat jaarlijks moet worden toegediend. Dit vaccin is echter kostbaar (6).

De aanvrager heeft het voornemen een veilig en effectief veterinair vaccin te ontwikkelen tegen RVFV dat ook in Europa toegelaten kan worden.

### *Rift Valley fever virus*

Het RVFV is een enkelstrengs (-) RNA virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie van de *Bunyaviridae*. Het genoom bestaat uit drie segmenten te weten het large (L), medium (M) en small (S) segment. Het S-segment bevat het nucleocapside gen (N) en het niet-structureel (NSs) gen dat betrokken is bij blokkering van interferon genexpressie (2). Het M-segment bevat het gen dat codeert voor een tweetal oppervlakte-eiwitten genaamd Gn en Gc. Na translatie wordt door een signaalpeptidase de splitsing in

twee eiwitten bewerkstelligd. Het Gn en Gc eiwit zijn betrokken bij de interactie van het virus met de cel. Het M-segment codeert tevens voor het niet-structurele eiwit, genaamd NSm, dat een anti-apoptotische functie heeft. Het L-segment codeert voor het polymerase (P).

Het virus wordt onder dieren voornamelijk verspreid door verschillende muggen (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Eretmapodites*, *Mansonia*, etc.) (1). In de eitjes van de mug *Aedes lineatopennis* kan het virus latent aanwezig blijven. Onder mensen vindt verspreiding voornamelijk plaats via direct of indirect contact met bloed of organen van geïnfecteerde dieren. Ook inhalatie van aërosolen die vrijkwamen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren heeft geresulteerd in infectie van mensen. Door middel van aërosolen zijn in het verleden ook laboratoriummedewerkers besmet geraakt. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat humane infecties ook het gevolg zijn van de consumptie van ongepasteuriseerde melk van besmette dieren (1). Infecties door muggenbeten zijn ook bij de mens gerapporteerd. Tot op heden zijn er geen gevallen bekend waarbij het virus overgedragen werd van mens op mens (1).

Het virus is in België, Duitsland en Engeland geclassificeerd als een klasse 3 pathogeen (3). In Nederland is dit virus nog niet eerder geclassificeerd.

### **De voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager gaat drie benaderingen volgen om uiteindelijk te komen tot een nieuw vaccin tegen RVFV. De eigenschappen van de vaccinkandidaten zullen vervolgens worden bestudeerd in zoogdier- en insectencellijnen. Daarna worden virulentie en effectiviteit getest in kleine proefdieren. De COGEM is gevraagd te adviseren over één van deze drie benaderingen.

Deze benadering berust op de ontwikkeling van het vaccin op basis van een levend verzwakt RVFV. Hiertoe worden DNA-kopieën van individuele genoomsegmenten van RVFV (L, M en S) geconstrueerd volgens een recent beschreven methode (4). Vervolgens worden gerichte mutaties aangebracht waarvan de aanvrager verwacht dat ze de virulentie van het virus zullen verminderen. Ook wordt het fluorescentiegen eGFP of *Renilla* luciferase ingebracht. Vervolgens onderscheidt de aanvrager twee werkwijzen waar hieronder nader op zal worden ingegaan.

### *Productie volledig RVFV*

De aanvrager wil het volledige RVFV en daarvan afgeleide mutanten produceren in zoogdiercellijnen. Hij wil dit doen op ML-III niveau waarbij de handelingen zullen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet klasse-III, een zogenaamde 'glovebox'. Geschikte vaccinkandidaten zullen vervolgens op virulentie en beschermende

eigenschappen worden getoetst in kleine knaagdieren. De dieren zullen worden gehuisvest in een onderdrukisolator voorzien van HEPA-filter die geplaatst is in een DM-III faciliteit. De weefsels en cellen van de dieren zullen daarna onderzocht worden. De aanvrager is voornemens dit te doen in een veiligheidskabinet van klasse-III.

#### *Productie van genoomsegmenten*

Naast productie van het volledige virus heeft de aanvrager het voornemen RVFV genoomsegmenten te produceren in animale cellen. Hiervoor wordt ieder genoomsegment gekloneerd in een zogenaamd transcriptieplasmide waarbij de transcriptie van deze segmenten onder controle van een T7-promoter staat. Wanneer animale cellen die het T7-polymerase produceren hiermee worden getransfected zal viraal RNA worden geproduceerd, dat vervolgens kan worden vermenigvuldigd door het virale polymerase. In onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens maximaal twee van de drie volledige of onvolledige genoomsegmenten te co-transfecteren. Bovendien is het te transfecteren materiaal vrij van RVFV en andere bunyavirussen.

De aanvrager wil deze experimenten uitvoeren in een ML-II geclassificeerde ruimte. Beproeving van geschikte vaccinkandidaten op proefdieren zal in een later stadium plaatsvinden en is daarmee geen onderdeel van deze vergunningaanvraag.

#### **Inschaling en advies**

De COGEM heeft nog niet eerder over de inschaling van het RVFV geadviseerd. Het virus is door verschillende instanties geclassificeerd als een pathogeen van klasse 3 (3). In de Regeling genetisch gemodificeerde organismen wordt de pathogeniteit van micro-organismen bepaald op basis van de aard van de ziekte, de verspreiding onder de bevolking en de aanwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling (7). De COGEM heeft eerder een advies uitgebracht over de inschaling van dierpathogene virussen. Omdat het hier zowel een humaan- als dierpathogeen betreft dient het virus ingeschaald te worden volgens de pathogeniteitsklasse indeling zoals deze gehanteerd wordt voor humane pathogenen (8).

Hoewel RVFV een ernstige ziekte kan veroorzaken, is de mate van mortaliteit gering. Het virus wordt daarnaast voor zover bekend niet overgedragen van mens op mens. Er is geen effectieve behandeling of vaccin voorhanden. Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM het RVFV te classificeren als klasse 3 pathogeen. Hieruit volgt dat handelingen met het wildtype virus uitgevoerd dienen te worden op ML-III niveau. De productie van RVFV en infectie van animale cellen met dit virus en hiervan afgeleide mutanten, dient daarom plaats te vinden op ML-III niveau. Met het uitvoeren van deze handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-III acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De vaccinatie van kleine knaagdieren met geschikte vaccinkandidaten en de challenge-experimenten zullen worden uitgevoerd in een DM-III faciliteit. De dieren zijn gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter. De COGEM acht de kans dat het virus zich tijdens deze experimenten in het milieu kan verspreiden en daarmee risico's voor mens en milieu kan opleveren, verwaarloosbaar klein. De aanvrager gaat tevens de cellen en weefsels van de dieren bestuderen onder een microscoop. Deze microscoop zal zich bevinden in het veiligheidskabinet van klasse-III waardoor de COGEM verspreiding van het virus in het milieu verwaarloosbaar klein acht.

Zoals eerder vermeld is de aanvrager ook van plan om animale- en insectencellen te transfacteren met een combinatie van individuele genoomsegmenten van het RVFV. Hiervoor zal ieder genoomsegment gekloneerd worden in een zogenaamd transcriptieplasmide. De transfectie zal plaatsvinden met maximaal twee volledige of onvolledige genoomsegmenten. Door de afwezigheid van tenminste één genoomsegment kan er geen reconstructie (rescue) van infectieus virus optreden. Bovendien is complementatie met wildtype RVFV en andere bunyavirussen uitgesloten aangezien de te transfacteren cellen vrij zijn deze virussen. De COGEM acht derhalve de kans op het ontstaan van een autonoom replicerend infectieus virus verwaarloosbaar klein. Een inschaling op ML-II niveau waarbij de handelingen worden uitgevoerd in een ML-II kabinet acht zij daarmee gerechtvaardigd.

De COGEM merkt op dat bij de uitvoering van bovengenoemde experimenten met twee genoomsegmenten geen autonoom replicerend virus kan ontstaan. Echter contaminatie met een derde segment door insleep van plasmide DNA of andere menselijke fouten kan leiden tot het ontstaan van een replicatie competent virus. Daarom wijst de COGEM erop dat de uitvoerders van de experimenten alert moeten zijn op het voorkomen van dergelijke contaminaties. Met het in acht nemen van de Veilige Microbiologische Technieken kunnen deze contaminaties afdoende vermeden worden.

### **Conclusie**

Concluderend is de COGEM van mening dat door de aanvrager voorgestelde experimenten met het volledige RVFV kunnen worden uitgevoerd op ML-III dan wel DM-III niveau met inachtneming van de gestelde aanvullende voorschriften. De experimenten waarbij individuele genoomsegmenten worden geproduceerd kunnen plaatsvinden op ML-II niveau met de gestelde aanvullende voorschriften.

## Referenties

1. World Organisation for Animal Health (2002). Rift Valley Fever. Internet: [www.oie.int/eng/maladies/fiches/a\\_A080.htm](http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A080.htm) (3 maart 2008)
2. Billecocq A, Spiegel M, Vialat P *et al.* (2004). NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of virology* 78: 9798–9806
3. American Biological Safety Association. Risk group classification for infectious agents. Rift valley fever. Internet: [www.absa.org/riskgroups/viruses.html](http://www.absa.org/riskgroups/viruses.html) (3 maart 2008).
4. Bird BH, Albariño CG en Nichol ST (2007). Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo and may provide a model of human delayed onset neurologic disease. *Journal of Virology* 362: 10-15
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rift valley fever – East Africa, 1997-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 47:261-264
6. Canadian Food Inspection Agency. Pathogen safety data sheet. Rift Valley Fever. Internet: [www.inspection.gc.ca](http://www.inspection.gc.ca) (6 maart 2008)
7. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
8. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. Criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04.