

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J. J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 15 augustus 2011
KENMERK CGM/110815-03
ONDERWERP Advies: Classificatie van Vesicular stomatitis virus

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 10-015 met de titel 'Vervaardiging van recombinante VSV-virussen gepseudotypeerd met virale fusie-eiwitten en het gebruik hiervan in virus-cell entry studies' van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)VSV vectoren. VSV is een negatief enkelstrengs RNA virus uit de familie *Rhabdoviridae*.

VSV veroorzaakt de ziekte 'vesicular stomatitis' in vee, waaronder paarden en varkens. Deze ziekte lijkt op mond- en klauwzeer, maar leidt nauwelijks tot sterfte. VSV kan overgedragen worden door direct contact, via insecten of via inhalatie. Ook mensen kunnen geïnfecteerd worden, maar worden meestal niet ziek en dragen het virus niet aan elkaar over. Er bestaat nog geen specifieke behandeling tegen vesicular stomatitis bij dieren en mensen. Het virus komt endemisch voor in Zuid- en Centraal Amerika.

Gebaseerd op de criteria in het algemene COGEM advies over classificatie van dierpathogenen adviseert de COGEM VSV in te delen in dierpathogeniteitsklasse 3. Dit omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen, niet enzoötisch aanwezig is en er geen profylaxe of therapie beschikbaar is, zodat de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn. De aanvrager wil voor de werkzaamheden met gg-VSV gebruik maken van de laboratoriumstam San Juan van het Indiana serotype. Vanwege de afwezigheid van onderbouwing voor attenuering van deze stam kan de COGEM niet instemmen met omlaagschaling van de stam naar klasse 2. Zij adviseert de werkzaamheden met infectieus gg-VSV daarom uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, met de voorgestelde aanvullende voorwaarden. Kloneringswerkzaamheden in *E. coli* met gg-VSV kunnen uitgevoerd worden op ML-I niveau omdat er geen infectieus virus kan worden gevormd. Op genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. R.J. de Groot niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Classificatie van *Vesicular stomatitis virus* en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde VSV deeltjes

COGEM advies CGM/110815-03

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)VSV vectoren. De aanvrager, de Universiteit Utrecht, vraagt een wijziging aan van de vergunning IG 10-015 met de titel 'Vervaardiging van recombinante VSV-virussen gepseudotypeerd met virale fusie-eiwitten en het gebruik hiervan in virus-cell entry studies'. De huidige vergunning vergunt alleen werkzaamheden met gepseudotypeerde VSV virionen die wel infectieus maar niet replicatiecompetent zijn. In de wijziging worden werkzaamheden aangevraagd waarbij virussen worden geproduceerd die wel in staat zijn tot zelfstandige virusreproductie. Het virus dat op deze wijze ontstaat, is in principe zowel infectieus als replicatiecompetent.

Vesicular stomatitis virus

Het VSV is een negatief enkelstrengs RNA virus dat behoort tot het genus *Vesiculovirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*. Het genus *Vesiculovirus* omvat 28 verschillende virussoorten die zowel insecten als zoogdieren kunnen infecteren.¹ Een aantal van deze insecten, waaronder zandvliegen, kunnen het VSV overdragen op dieren. Het VSV kan ook overgedragen worden via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren of via inhalatie van besmette aerosolen.^{1,2}

VSV is enzoötisch in Mexico, Centraal Amerika, het noordelijk deel van Zuid Amerika en Oost Brazilië. De twee meest prevalentie serotypen in deze gebieden zijn New Jersey (VSV-NJ) en Indiana (VSV-Ind). VSV veroorzaakt de ziekte 'vesicular stomatitis' in vee, waaronder paarden en varkens.³ Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren en lijkt daarmee sterk op mond- en klauwzeer.¹ De mortaliteit in dieren is zeer laag.¹ In endemische regio's wordt vesicular stomatitis het meest veroorzaakt door het VSV-NJ serotype.³ Er bestaat nog geen specifieke behandeling tegen vesicular stomatitis bij dieren. De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSV herstellen binnen twee weken.¹ Opgemerkt moet worden dat een uitbraak van VSV grote economische schade tot gevolg kan hebben.

Het VSV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren of via blootstelling aan het virus in het laboratorium.^{2,3} De meeste humane infecties verlopen zonder klinische verschijnselen. Mensen die wel ziek worden, ontwikkelen in eerste instantie hoge koorts gevolgd door griepachtige symptomen, waaronder hoofdpijn, misselijkheid, spierpijn en gewrichtspijn. De ziekte duurt doorgaans drie tot zes dagen en wordt niet geassocieerd met complicaties of sterfte.^{1,3} Verspreiding tussen mensen onderling is tot op

heden niet in de literatuur gerapporteerd.⁴ Er is nog geen specifieke behandeling van patiënten voorhanden. De behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding.

Vesicular stomatitis virus genoom

Het VSV heeft een enkelstrengs RNA genoom van negatieve polariteit. Het genoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het zogenaamde nucleoproteïne (N-eiwit), het phosphoproteïne (P-eiwit), het matrixproteïne (M-eiwit), het glycoproteïne (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).² Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje dat bestaat uit een zogenaamd nucleocapside. De N, L en P eiwitten vormen een RNA afhankelijk RNA polymerase complex welke verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie.³ Het G-eiwit bevindt zich in het lipidemembraan en is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheer cel.² Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, het verlaten van de cel door budding en apoptose van de cel.³

Classificatie

In de Regeling GGO worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.⁵ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse. Virussen behorend tot de *Rhabdoviridae* worden volgens de lijst van pathogene micro-organismen en agentia ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

In 2006 heeft de COGEM een algemeen advies uitgebracht waarin de criteria voor de inschaling van dierpathogene virussen in pathogeniteitsklassen zijn aangegeven, inclusief de daaraan gekoppelde werk- en inrichtingsvoorschriften voor recombinant DNA werkzaamheden.⁶ Deze inrichtings- en werkvoorschriften wijken af van de voorschriften bij de normale pathogeniteitsklassen zoals vermeld in de Regeling GGO, omdat bescherming van de laboratoriummedewerkers bij dierpathogenen minder van belang is.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil het 'cell-entry' mechanisme van verschillende virale fusie-eiwitten bestuderen. Hiervoor is de productie van in trans gepseudotyperde VSV virionen vergund. De aanvrager wil nu ook chimere VSV virionen produceren, waarin de coderende sequentie voor het endogene G-eiwit vervangen wordt door de sequenties van virale fusie-eiwitten afkomstig uit *Influenzavirus A*, *coronavirussen*, *rhabdovirussen*, *paramyxovirussen*, *bunyavirussen*, *Nairovirus*, *Hantavirus* en *baculovirussen*.

Voor de productie van deze chimere deeltjes wil de aanvrager de vector pVSVdG-eGFP toevoegen aan de huidige vergunning. Deze vector bevat de cDNA sequentie van VSV samen met een eGFP sequentie. Het gen coderend voor het endogene virale G-eiwit is uit de vector verwijderd. Het cDNA is volgens de aanvrager gebaseerd op stammen van het Indiana serotype.

De N, P, M en L genen zijn afkomstig van een laboratoriumstam genaamd San Juan.⁷ De virussen die met behulp van de vector worden geproduceerd, zijn volgens de aanvrager in staat tot zelfstandige virusreproductie. Het virus dat op deze wijze ontstaat, is in principe zowel infectieus als reproductiecompetent. De aanvrager merkt op dat handelingen met reproductiecompetent virus in een ML-II veiligheidskabinet zullen worden uitgevoerd. Bureau GGO stelt voor hierbij handschoenen tot over de mouw van de werkkleding verplicht te stellen.

Overweging en advies

Classificatie

Internationaal bestaat er nog geen consensus over de classificatie van VSV. In Engeland en Duitsland wordt VSV geclassificeerd als een Risk Group 2 pathogeen. In de Verenigde Staten, Canada, België, Singapore, Australië en Nieuw-Zeeland wordt VSV geclassificeerd als een Risk Group 3 pathogeen.^{8,9,4}

VSV is een belangrijk dierpathogeen dat een breed gastheerbereik kent en grote schade kan toebrengen aan dierpopulaties, waaronder koeien, paarden en varkens. Mensen kunnen geïnfecteerd raken, waarbij infectie meestal asymptomatisch verloopt. Tot op heden is er nog geen profylaxe of therapie beschikbaar. De huidige behandeling bestaat uit symptoombestrijding. De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSV herstellen binnen twee weken. Overdraagbaarheid van mens op mens is tot nu toe niet gerapporteerd.

Omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen, niet enzoïetisch aanwezig is en er geen profylaxe of therapie beschikbaar is, kunnen de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk zijn. Het virus is voor mensen weinig pathogeen. Echter, gezien de gevolgen van een uitbraak van het virus, adviseert de COGEM wildtype VSV als een dierpathogeen van klasse 3 in te delen, volgens de criteria geformuleerd in haar algemene advies over dierpathogene virussen.⁶

De aanvrager merkt op dat verschillende stammen van het VSV-Indiana serotype sinds lange tijd in het laboratorium worden gebruikt en gezien worden als verzwakt ten opzichte van virulente VSV stammen. De aanvrager verwijst hiervoor naar de National Institutes of Health in de Verenigde Staten, die de San Juan stam van het Indiana serotype heeft ingedeeld in Risk Group 2.⁹ De COGEM heeft geen beschikking over literatuur waaruit duidelijk blijkt dat deze stam geattenuëerd is. De COGEM is van mening dat zonder deze informatie omlaagschaling van de VSV Indiana - San Juan stam niet te verantwoorden is.

Inschaling van werkzaamheden met gg-VSV

De aanvrager is voornemens reproductiecompetente gg-VSV te produceren en deze in *in vitro* experimenten te gebruiken. De uitgangsstam voor deze experimenten is de VSV Indiana – San Juan stam. De aanvrager wil een vector gebruiken die het genoom van VSV bevat en een insertie van het zogenaamde ‘Enhanced Green Fluorescent Protein’ (eGFP). Het G-eiwit is uit het genoom verwijderd en wordt vervangen door sequenties van heterologe virale oppervlakte eiwitten.

Insertie van heterologe genen ter vervanging van een endogeen gen leidt meestal tot attenuering van een virus. Voor VSV is beschreven dat replicatie van gg-VSV met genen coderend voor glycoproteïnen afkomstig van heterologe virussen (waaronder *Marburgvirus*, *Zaire ebolavirus*, *Lassa virus* en *baculovirussen*) afneemt ten opzichte van het wild-type virus.^{10,11} Daarnaast zal de introductie van eGFP volgens de aanvrager een negatief effect hebben op de fitness van gg-VSV.

Echter, vanwege de classificatie van VSV als een klasse 3 dierpathogeen en de afwezigheid van onderbouwing voor omlaagschaling van de laboratoriumstam VSV Indiana - San Juan adviseert de COGEM de werkzaamheden met infectieuze virusdeeltjes van deze stam uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. De COGEM kan instemmen met de voorgestelde aanvullende voorwaarden om te voorkomen dat de laboratoriummedewerker besmet raakt. Kloneringswerkzaamheden met VSV kunnen uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau, omdat er bij de voorgenomen werkzaamheden in *E. coli* geen infectieus virus kan worden gevormd.

Conclusie

Omdat VSV gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen, niet enzoëtisch aanwezig is in Nederland en er geen profylaxe of therapie beschikbaar is, kunnen de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk zijn. Gezien de gevolgen van een uitbraak van het virus adviseert de COGEM wildtype VSV als een dierpathogeen van klasse 3 in te delen, volgens de criteria geformuleerd in haar algemene advies over dierpathogene virussen.

De uitgangsstam die de aanvrager wil gebruiken, VSV Indiana - San Juan, is een laboratoriumstam. Omdat er geen onderbouwing in het dossier geleverd is, of bij de COGEM bekend is, voor attenuering van de stam, kan de COGEM niet instemmen met omlaagschaling van de stam naar dierpathogeniteitsklasse 2. Hieruit volgt dat werkzaamheden met replicatiecompetent gg-VSV Indiana - San Juan op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd moeten worden. De COGEM stemt in met de voorgestelde aanvullende voorwaarden om te voorkomen dat de laboratoriummedewerker besmet raakt. De voorgenomen kloneringswerkzaamheden met VSV in *E. coli* kunnen uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau, omdat er geen infectieus virus kan worden gevormd.

Op genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. *Vet J.* 157:239-60
2. Rose JK & Whitt MA (2001). *Rhabdoviridae*: the viruses and their replication. In *Fields Virology*.

Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1221-1244

3. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med.* 10:210-6.
4. Public Health Agency of Canada (PHAC). www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/stomatit-eng.php (10 augustus 2011)
5. Regeling GGO (2010). [http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten regelgeving/Regelinggenetisch-gemodificeerde-organismen.pdf](http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regelinggenetisch-gemodificeerde-organismen.pdf)
6. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
7. Huang AS *et al.* (1986). Characterization of virulent isolates of vesicular stomatitis virus in relation to interference by defective particles. *Microbial Pathogenesis* 1:205-215
8. American Biological Safety Association (ABSA). www.absa.org/riskgroups/virusesssearch.php?viralgrou=Rhabdoviridae (10 augustus 2011)
9. National Institutes of Health, Verenigde Staten. http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guidelines/APPENDIX_B.htm (10 augustus 2011)
10. Garbutt M *et al.* (2004). Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol.* 78:5458-65
11. Kaname Y *et al.* (2010). Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/decay-accelerating factor into viral particles bearing Baculovirus GP64. *J Virol.* 84:3210-9