

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

DATUM 4 januari 2012
KENMERK CGM/120104-01
ONDERWERP Advies: Werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus*

Geachte heer Atsma,

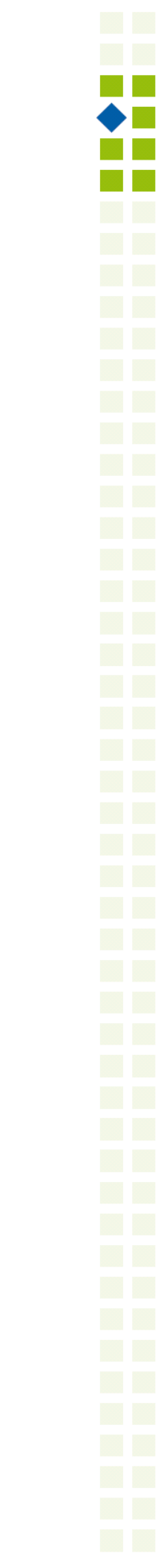
Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 11-071 met de titel 'Klonering en expressie van coronavirus- en vogel/zoogdiergenen en genereren recombinant IBV coronavirus' van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

Infectious bronchitis virus (IBV) is een positiefstrengs RNA virus uit de *Coronaviridae* familie, dat wereldwijd een belangrijk pathogeen is bij kippen. Het veroorzaakt aandoeningen aan de luchtwegen, de nieren en/of het voortplantingssysteem, waarbij sterfte tot 50% op kan lopen. Het virus verspreidt zich snel onder kippen en is enzoötisch in Nederland aanwezig. Het gastheerbereik van IBV is beperkt tot kippen en mogelijk andere vogels. Vanwege de beschikbaarheid van vaccins tegen IBV, schaaft de COGEM IBV in als klasse 2 pathogeen.

De aanvrager wil recombinante IBV partikels maken door regio's of (gedeeltes van) genen van verschillende IBV stammen met elkaar te combineren. Met deze partikels worden animale cellen, eieren en kippen geïnfecteerd. De COGEM is van mening dat het celtropisme en de pathogeniteit van de recombinante IBV virussen kunnen veranderen, maar dat het combineren van verschillende stammen van IBV niet zal leiden tot een virus met een hogere pathogeniteitsklasse dan de uitgangsstammen.

Concluderend acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij handelingen met chimere IBV partikels al dan niet in associatie met proefdieren bij de voorgestelde ML-II en DM-II inperkingsniveaus met specifieke aanvullende voorwaarden verwaarloosbaar klein.



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 belangenverstrengelingen is het COGEM lid dr. R.J. de Groot niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus*

COGEM advies CGM/120104-01

Inleiding

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over een verzoek tot wijziging van de vergunning getiteld 'Klonering en expressie van coronavirus- en vogel/zoogdiergenen en genereren recombinant IBV coronavirus' (IG 11-071). Het verzoek is ingediend door de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. De aanvrager heeft een vergunning voor klonering en transfectie-experimenten met individuele sequenties van *Infectious bronchitis virus* (IBV) en andere coronavirussen. In de wijzigingsaanvraag gaat het om het toevoegen van het kloneren van complete en gedeeltelijke IBV genomen en werkzaamheden met recombinante IBV varianten, die infectieus zijn. De aanvrager wil chimere IBV varianten maken met sequenties uit verschillende IBV stammen, en animale cellen en kippen met deze gg-virussen infecteren. Het doel van het onderzoek is de karakterisatie van genen en genproducten van IBV, de ontwikkeling van diagnostica, vaccins en antivirale middelen, en het bestuderen van het replicatiemechanisme, de epidemiologie en de evolutie van het virus.

Infectious bronchitis virus

IBV is een bekend pathogeen van kippen in de pluimvee-industrie over de gehele wereld.¹ Infectie met IBV veroorzaakt, afhankelijk van de stam, een aandoening aan de luchtwegen, aan de nieren en/of aan het voortplantingssysteem. Secundaire bacteriële infecties leiden vaak tot complicaties. Infectie met IBV kan in kuikens veelal tot de dood leiden. Het virus verspreidt zich via hoesten of feces, en blijft langere tijd in geïnfecteerde vogels aanwezig. De morbiditeit in een populatie kan oplopen tot 100%, maar is in veldsituaties volgens de aanvrager meestal lager vanwege vaccinatie. De mortaliteit kan 20 tot 50% zijn. Er zijn verschillende commerciële vaccins in gebruik die zijn gebaseerd op levende verzwakte of geïnactiveerde IBV stammen, en die meer of minder werkzaam zijn tegen de verschillende virulente IBV stammen in het veld.¹

Literatuur over het gastheerbereik van IBV is niet eenduidig, mogelijk vanwege de grote genetische diversiteit tussen IBV stammen. Coronavirussen worden gekarakteriseerd als virussen met een of enkele specifieke gastheren, omdat coronavirussen binden aan specifieke eiwitreceptoren op gastheercellen.² IBV stam M41 bindt bijvoorbeeld nauwelijks aan respiratoire weefsels van ganzen, terwijl binding aan weefsels van kippen efficiënt is.³ Echter, hoewel IBV voornamelijk kippen infecteert, zijn IBV stammen en nauw verwante virussen ook bij andere vogelsoorten gevonden.^{4,5} Er wordt in de literatuur op gewezen dat wilde vogelsoorten als reservoir en vector kunnen dienen voor verspreiding van IBV over lange afstand.⁵ Er is nooit melding gemaakt van infecties van IBV bij mensen.

Taxonomie van de Coronaviridae familie

IBV behoort tot het genus *Gammacoronavirus* binnen de familie van de *Coronaviridae*.⁶ Recent heeft het 'International Committee on Taxonomy of Viruses' de taxonomie van deze familie

herzien en de subfamilie *Coronavirinae* onderverdeeld in drie genera, *Alpha-*, *Beta-* en *Gammacoronavirus*.⁶ IBV wordt niet langer als een virusspecies beschouwd maar als een subtype van het nieuw toegevoegde *Avian coronavirus* (ACV). Naast IBV is ook het *Turkey coronavirus* een subtype van ACV.

Genomische organisatie van IBV

IBV is een positiefstrengs RNA virus, dat met 27,6 kb het grootste genoom heeft van de RNA virussen. Het genoom codeert voor vier structurele eiwitten: het gefosforyleerde nucleocapside eiwit (N), het integrale membraanglycoproteïne (M-eiwit), het 'spike' glycoproteïne (S) en het 'envelop' membraaneiwit (E). Het genoom wordt ingepakt in een virusdeeltje met bolvormige spike-eiwitten op het oppervlak van het lipidemembraan. Het spike-eiwit zorgt voor binding van het virus aan de cel en membraanfusie door interactie met een nog onbekende cellulaire receptor. De pathogeniteit en gastheerspecificiteit wordt voornamelijk maar niet exclusief door het spike-eiwit bepaald.

Replicatie van het RNA genoom van IBV vindt plaats via een uniek mechanisme dat start met de synthese van een volledige negatiefstrengs kopie van het genoom wat dient als sjabloon voor de productie van nieuwe virale genomen. De transcriptie is een complex proces waarbij meerdere subgenomische RNAs van verschillende grootte met dezelfde 3' terminale sequenties gemaakt worden.^{2,6} Gedurende de synthese van de positieve en negatieve RNAs in de cel treden er frequent mutaties en recombinaties op.

De voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil chimere IBV partikels vervaardigen en deze onderzoeken in animale cellen, eieren en kippen. cDNA kopieën van complete of defectieve genomen van IBV zullen worden gekloneerd in *E.coli*. *In vitro* worden de cDNAs geligeerd tot chimere recombinante IBV genomen, die daarna *in vitro* worden afgeschreven tot RNA. Het RNA wordt gebruikt voor transfectie van animale cellen om infectieuze IBV deeltjes te produceren. Om de eigenschappen van het virus in dieren te bestuderen zullen bevruchte eieren en kippen worden geïnfecteerd en zullen cellen en weefsels van deze kippen worden geanalyseerd.

Voor de chimere IBV partikels zal onderling uitwisseling plaatsvinden van genen of domeinen tussen de niet-virulente IBV vaccinstammen H120 en Beaudette en de virulente IBV stammen M41 en B1648. Deze stammen zijn allen geïsoleerd uit kippen. De chimere partikels kunnen structurele en niet-structurele genen of domeinen bevatten van de verschillende IBV stammen. Met name het spike eiwit zal worden bestudeerd via puntmutaties en uitwisseling van (delen van) het spike gen tussen IBV stammen.

Eerder advies

De COGEM heeft werkzaamheden met gg-IBV nog niet eerder beoordeeld. IBV is als vertegenwoordiger van de *Coronaviridae* volgens de 'Lijst van pathogene micro-organismen en agentia' ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁷ In België wordt IBV als dierpathoog van klasse 2 beschouwd.⁸

Overweging en advies

Classificatie IBV

De COGEM schaaft IBV in als klasse 2 pathogeen. Het virus is enzoötisch in Nederland aanwezig. Het gastheerbereik van IBV is beperkt tot kippen en mogelijk andere vogels. De overdracht van het virus vindt gemakkelijk plaats door middel van aërosolen en oraal-fecaal contact. Effectieve vaccins zijn beschikbaar en worden toegepast, waardoor verspreiding is tegen te gaan.

De ontwikkeling van nieuwe vaccins voor nieuwe varianten van IBV blijft echter noodzakelijk. Vaccinatie lijkt een beperkte algemene bescherming tegen IBV te bieden. Nieuwe IBV varianten of serotypen kunnen ziekte veroorzaken bij gevaccineerde kippen, zoals IBV 4/91 in de jaren '90.¹ Vanwege de relatief hoge mate van recombinatie in IBV en het ontstaan van nieuwe serotypen, zou een nieuw IBV kunnen ontstaan dat bij ontsnapping tot een uitbraak van ziekte onder kippen kan leiden.

Werkzaamheden met chimeer IBV

Het spike-eiwit is de voornaamste maar niet de exclusieve determinant van pathogeniteit en tropisme in IBV. In verschillende studies zijn de spike-eiwitten en het replicase-gen uitgewisseld tussen virulente en non-virulente IBV stammen.^{9,10,11} De virulentie van de recombinante stammen was hierbij verminderd ten opzichte van de uitgangsstammen. Ook in andere coronavirussen zijn chimere gemaakt binnen één virus, bijvoorbeeld bij het muizencoronavirus *Mouse hepatitis virus* (MHV). Deze chimere waren soms even virulent als één van de uitgangsvirussen,¹² maar in het merendeel van de gevallen bleken de chimere recombinante virussen geattenuëerd *in vivo*.¹³

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat het celtropisme en de pathogeniteit van een chimeer IBV virus kunnen veranderen, maar dat het combineren van verschillende stammen van IBV niet zal leiden tot een virus met een hogere pathogeniteitsklasse dan de uitgangsstammen.

Op grond van de inschaling van (chimeer) IBV in pathogeniteitsklasse 2, behoren werkzaamheden met chimere IBV partikels in het laboratorium in associatie met animale cellen, kippeneieren en kippenweefsel op ML-II inperkingsniveau plaats te vinden. De COGEM kan instemmen met de in de ontwerpbeschikking voorgestelde voorschriften:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;

Voorschriften specifiek bij de infectie van kippeneieren:

- de geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed;
- de dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet klasse II geopend en bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Handelingen met kippen in associatie met chimere IBV partikels moeten op DM-II niveau worden uitgevoerd. De COGEM kan instemmen met de in de ontwerpbeschikking voorgestelde aanvullende voorschriften:

- de dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd;
- na het beëindigen van het experiment worden de dieren geëuthanaseerd.

Onder de hierboven genoemde inperkingsniveaus en aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij handelingen met chimere IBV partikels al dan niet in associatie met proefdieren voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM wijst erop dat dit advies niet van toepassing is op de soort *Avian coronavirus*, maar slechts op het subtype *Infectious bronchitis virus*.

Referenties

1. De Wit JJ et al. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian pathology* 40:223-235
2. Knipe DM & Howley PM (editors) (2001). *Fields Virology*. Fourth edition.
3. Wickramasinghe INA et al. (2011). Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *Journal of Virology* 85:8903-8912
4. Hughes LA et al. (2009). Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerg Infect Dis.* 15:1091-1094
5. Cavanagh D (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian pathology* 34:439-448
6. King AMQ et al. (editors) (2011). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, Elsevier Academic Press
7. Bureau GGO, Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2010). Lijst van pathogene micro-organismen en agentia. November 2010.
<http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/Lijst%20van%20pathogene%20micro-organismen%20en%20agentia%20BGGO%20niet%20cursief.pdf>
8. Belgian biosafety server. Internet: www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (21-12-2011)
9. Hodgson T et al. (2004). Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *Journal of Virology* 78:13804-13811
10. Armesto M et al. (2011). A recombinant avian Infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS ONE* 6:e24352
11. Armesto M et al. (2009). The replicase gene of avian coronavirus Infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS ONE* 4:e7384
12. Navas-Martin S et al. (2007). Replicase genes of murine coronavirus strains A59 and JHM are interchangeable: differences in pathogenesis map to the 3' one-third of the genome. *Journal of Virology* 81:1022-1026
13. Phillips JJ et al. (2001). Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. *Journal of Neurovirology* 7:421-431