

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

DATUM 7 februari 2012
KENMERK CGM/120207-02
ONDERWERP Advies Ingeperkt gebruik van herpesvirusvaccins in lama's

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 11-096 met de titel 'Karakterisering van immunogene eiwitten van ziekteverwekkers voor toepassing als actieve stof in veterinaire vaccins' van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR te Lelystad, deelt de COGEM u het volgende mee:


Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over een wijzigingsverzoek van een vergunning voor handelingen met lama's die een mix van vectoren met verschillende virale antigenen krijgen geïnjecteerd. De aanvrager wil ook herpesvirussen inspuiten in de lama's en deze werkzaamheden op DM-I en D-I inperkingsniveau uitvoeren.

De uitbreiding van de vergunning betreft het op de markt toegelaten genetisch gemodificeerde (gg-) herpesvirusvaccin Vaxxitek HVT + IBD en drie niet-gg-herpesvirusvaccinstammen. Daarnaast wordt een verzwakte gg-kanariepokkenvirusstam (ALVAC) met influenza antigenen toegediend aan de lama's en zullen antigenen die in een plasmide zijn gekloneerd als DNA geïnjecteerd worden. De lama's worden meerdere malen geïnjecteerd. In de laatste ronde worden de herpesvirusvaccinstammen en Vaxxitek toegediend samen met de ALVAC stam en een plasmide. De gelijktijdige injecties worden gescheiden over drie spierweefsels van de lama.

De toegepaste virale stammen zijn allen geattenuëerd en kunnen niet repliceren in zoogdiercellen. De COGEM is van mening dat daardoor de kans op recombinatie tussen de virusstammen, de plasmiden en eventuele endogene aanwezige virussen in de lama's te verwaarlozen is. De COGEM ziet daarnaast geen redenen waarom de gebruikte inserts de virulentie of pathogeniteit van de virussen en vectoren zouden doen toenemen. De kans op, evenals het risico van, verspreiding van de virusstammen en gg-vectoren naar het milieu acht de COGEM verwaarloosbaar klein.

Op basis van bovenstaande overwegingen kan de COGEM instemmen met het verzoek van de aanvrager en acht zij de risico's van de handelingen voor mens en milieu 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 belangenverstremgeling is het COGEM lid Dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Ingeperkt gebruik van herpesvirusvaccins in lama's

COGEM advies CGM/120207-02

Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning (IG 11-096) met de titel 'Karakterisering van immunogene eiwitten van ziekteverwekkers voor toepassing als actieve stof in veterinaire vaccins'. De aanvrager wil antilichamen tegen verschillende virale, bacteriële en parasitaire antigenen opwekken bij lama's (*Lama glama*). Hiervoor zullen verschillende virussen en plasmiden met deze antigenen worden ingespoten bij drie lama's.

De aanvrager heeft al een vergunning, waarin de handelingen met drie lama's in associatie met kanariepokkenvirusstam ALVAC en/of plasmide pVR1012 vectoren met verschillende antigenen op DM-I en D-I inperkingsniveau zijn ingeschaald. De onderhavige wijziging betreft de toevoeging van drie herpesvirusvaccinstammen en het genetisch gemodificeerde Vaxxitek HVT +IBD. Vaxxitek HVT + IBD is een op de markt toegelaten genetisch gemodificeerde herpesvirus vaccin met een insert van het *Infectious bursal disease virus*. Omdat Vaxxitek toegelaten is voor vaccinatie van kippen, valt gebruik in lama's buiten de markttoelating en moet dit apart vergund worden.

Virale vectoren en virusstammen

Naast injectie met plasmiden met verschillende antigenen in de lama's, worden de volgende virale vectoren en virusstammen voor immunisatie van de lama's gebruikt:

- *Canarypox virus* met een hemagglutinine (HA) insertie van het *Equid influenza virus* (ALVAC + EIV);
- Virusstam Gallid herpesvirus 2 Rispens;
- Virusstam Gallid herpesvirus 3 SB1;
- Virusstam Gallid herpesvirus 1 T20;
- *Meleagrid herpesvirus 1* met een insertie van *Infectious bursal disease virus* (Vaxxitek HVT + IBD).

Hieronder worden deze virale vectoren en virusstammen kort besproken.

ALVAC expressievector

ALVAC is een kanariepokkenvirusstam die is geattenuëerd door meer dan tweehonderd seriële passages in embryonale kippencellen. ALVAC is alleen in staat tot replicatie in cellen van kanaries en bepaalde andere vinkachtigen uit de familie *Fringillidae*, maar veroorzaakt in deze vogels geen ziekte.¹ ALVAC kan niet repliceren in zoogdieren of zoogdiercellen, maar brengt wel ingevoegde antigenen tot expressie.² ALVAC heeft een lange historie van veilig gebruik en is uitgebreid getest in veel verschillende soorten waaronder vogels, konijnen, cavia's, muizen, niet-humane primaten, katten, honden en mensen.^{3,4,5}

Herpesvirussen

De herpesvirussen die de aanvrager wil toepassen in lama's zijn drie niet-gemodificeerde vaccinstammen en één genetisch gemodificeerd combinatievaccin. De vaccins zijn allen gebaseerd op virussen uit de familie *Herpesviridae* die pluimvee infecteren. Drie van de vier virussen behoren tot het *Mardivirus* genus, het vierde virus tot het nauw verwante genus *Iltovirus*.

De stammen Gallid herpesvirus 2 (ook wel Marek's disease virus 1) Rispens, Gallid herpesvirus 3 (ook wel Marek's disease virus 2) SB1 en Gallid herpesvirus 1 (ook wel Infectious laryngotracheitis virus) T20 zijn commercieel verkrijgbaar als levende vaccins tegen Marek's ziekte en tegen infectieuze laryngotracheitis^{6,7} en worden al sinds lange tijd bij pluimvee toegepast. Marek's ziekte is een zeer besmettelijke tumorziekte bij kalkoenen, kippen en kwartels. De Rispens vaccinstam is een mild virulente variant van *Gallid herpesvirus 2*, die door middel van seriële passages in celcultures verder is geattenuëerd.⁸ De vaccinstammen zijn niet pathogeen voor pluimvee of andere dieren.

Vaxxitek HVT + IBD is een genetisch gemodificeerd herpesvirusvaccin dat sinds 2002 in de EU is toegelaten voor gebruik in kippen.⁹ Het levende vaccin is gebaseerd op *Meleagrid herpesvirus 1* (ook wel Turkey herpesvirus of Marek's disease virus 3 genoemd) met een VP2 sequentie van het *Infectious bursal disease virus*. Het wordt gebruikt om de ziekte van Marek en de ziekte van Gumboro (infectieuze bursitis) bij kippen te voorkomen. Het vaccin is apathogeen voor zoogdieren. In kippen en kalkoenen kan het vaccin wel repliceren, maar niet in zoogdieren zoals lama's en de mens.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil antilichamen tegen verschillende virale, bacteriële en parasitaire antigenen opwekken bij lama's. Hiervoor zullen verschillende plasmiden en virale vectoren worden ingespoten bij drie lama's.

Het plasmide pVR1012, dat is opgenomen in Bijlage 2 van de Regeling GGO, zal in de experimenten antigenen bevatten afkomstig van virussen, een bacterie (*Campylobacter jejuni*) en een parasiet (*Leishmania* spp.). Ook wordt een CD154 sequentie uit kippen gebruikt om de immunisatie te versterken.

- HA van *Influenza A virus* bij paarden;
- CjaA of CjaD van *Campylobacter jejuni* (ook CjaA en CjaD samen in chimere vorm gecombineerd met CD154 van kip);
- KMP11, SMT of CPB van *Leishmania* spp.;
- gB, gD, gE of gI van *Gallid herpesvirus 1*;
- gB, gC van *Gallid herpesvirus 2* en *3* of van *Meleagrid herpesvirus 1*;
- F van *Newcastle disease virus*.

In het experiment worden drie lama's (nr. 4-6) gebruikt. Er wordt vier maal geïmmuniseerd met een tussenpoos van drie à vier weken. In de laatste immunisatie worden zowel plasmiden, ALVAC vectoren als herpesvirussen gebruikt. De gelijktijdige injecties worden gescheiden over

drie spierweefsels van de lama. De aanvrager zal tijdens het experiment bloed en serum afnemen bij de lama's. Zeven dagen na de laatste injecties worden de lama's geëuthanaseerd.

De eerste twee maal krijgen de lama's een injectie in de nekspier met per lama een mix van pVR1012 plasmiden met verschillende antigenen. De derde maal krijgen de lama's een injectie in de nekspier met grotendeels dezelfde pVR1012 plasmiden, en krijgen lama 4 en 5 een injectie in de linkerbilspier met een ALVAC vector met HA van *Influenza A virus* van paarden. De vierde maal krijgen alle drie de lama's een *Campylobacter jejuni* plasmide immunisatie in de nekspier. Lama 4 en 5 krijgen een ALVAC met HA boost in de linkerbilspier. Daarnaast wordt in de rechterbilspier van lama 4 de herpesvirusvaccinstam Gallid herpesvirus 3 SB1 toegediend; lama 5 krijgt op deze plek de herpesvirusvaccinstammen Gallid herpesvirus 1 T20 en Gallid herpesvirus 2 Rispens; en lama 6 krijgt Vaxxitek toegediend in de rechterbilspier.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2002 geadviseerd over introductie in het milieu van een vaccin gebaseerd op *Meleagrid herpesvirus 1* met het F gen van het *Newcastle disease virus*.¹⁰ Het vaccin wordt in eieren geïnjecteerd. Omdat het *Meleagrid herpesvirus 1* geen ziekte veroorzaakt in zijn gastheer, kalkoenen, wordt het virus als apathogeen beschouwd. Er is jarenlange ervaring met het gebruik van *Meleagrid herpesvirus 1* als levend vaccin voor Marek's ziekte. Het virus wordt uitgescheiden via veerfollikels (veerstof) van de kippen, maar er vindt geen overdracht plaats tussen dieren, behalve tussen kalkoenen. De COGEM concludeerde dat er geen risico's waren voor mens en milieu.

Daarnaast heeft de COGEM in 2003 geadviseerd over de classificatie van de ALVAC expressievector.¹¹ ALVAC heeft een zeer specifiek gastheerbereik en is alleen in staat tot replicatie in cellen van kanaries en bepaalde vinkachtigen. De genomische veranderingen die hebben geleid tot de attenuatie van de stam zijn stabiel en bekend. De COGEM achtte de stam niet pathogeen voor mensen en dieren en heeft de stam geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.

Overweging en advies

De aanvrager wil antilichamen tegen verschillende virale, bacteriële en parasitaire antigenen opwekken bij lama's. Hiervoor zullen verschillende vectoren en virussen met oppervlakte-eiwitten of antigenen van pathogene virussen, een pathogene bacterie en een pathogene parasiet in combinatie met kippen-CD154 worden ingespoten bij drie lama's.

De toegediende virale vectoren en stammen zijn dierpathogenen die allen een specifiek gastheerbereik hebben in vogels. De virale vectoren en stammen kunnen niet overgedragen worden naar de mens en mensen infecteren. De COGEM acht de gebruikte virusstammen en gg-virale vectoren niet pathogeen voor de mens.

Een mogelijk risico van het experiment betreft recombinatie van de toegediende virussen en vectoren met in de lama's aanwezige herpesvirussen. Er zijn nog geen herpesvirussen gevonden die uniek zijn voor lama's.¹² Wel zijn er antilichamen tegen de alphaherpesvirussen *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) en *Equid herpesvirus 1* (EHV-1) gevonden bij lama's. BoHV-1 is

apathogeen, maar EHV-1 kan tot blindheid en neurologische symptomen leiden bij lama's.^{13,14} De COGEM is van mening dat indien herpesvirussen aanwezig zijn in lama's, deze virussen in een latente staat aanwezig zullen zijn in neurale cellen of lymfoïde cellen. De herpesvirusvaccins worden in spierweefsel van de lama's toegediend en colocalisatie is daarmee zeer onwaarschijnlijk. De ALVAC vector en plasmide vectoren worden beide in een ander spierweefsel dan de herpesvirussen toegediend. Omdat de toegediende virusstammen en virale vectoren bovendien geen replicatie in zoogdieren vertonen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er recombinatie plaats zal vinden tussen de toegediende virusstammen en virale vectoren, of dat er recombinatie plaats zal vinden tussen een toegediend virus en een in de lama aanwezig virus. Daarmee is de kans op verdere verspreiding van de toegediende virusstammen en gg-virale vectoren verwaarloosbaar klein.

De gebruikte virussen worden allen sinds langere tijd toegepast als vaccin bij pluimvee en zijn niet pathogeen voor zoogdieren. De COGEM ziet geen redenen waarom de gebruikte inserts de virulentie of pathogeniteit van de virussen en vectoren zouden doen toenemen. Concluderend is de COGEM van mening dat er geen risico's zijn voor mens en milieu in het theoretische geval van verspreiding van de genetisch gemodificeerde virale vectoren naar het milieu.

Op basis van bovenstaande kan de COGEM instemmen met het uitvoeren van de werkzaamheden met lama's op inperkingsniveau's DM-I en D-I. Analyse van afgenomen bloed of serum van de lama's kan op ML-I inperkingsniveau plaatsvinden. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder de hier genoemde inperkingsniveau's verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Kirmse P (1969). Host specificity and pathogenicity of pox viruses from wild birds. *Wildl Dis.* 5: 376-386
2. Weyer J *et al.* (2009). Poxvirus-vectored vaccines for rabies – a review. *Vaccine* 27: 7198-7201
3. Taylor J *et al.* (1994). Applications of canarypox (ALVAC) vectors in human and veterinary vaccination. *Dev Biol Stand* 82: 131-135
4. Taylor J *et al.* (1995). Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine* 13(6): 539-549
5. Cadoz M *et al.* (1992). Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. *Lancet* 339: 1429-32
6. Ceva vaccines Cevac MD Rispens en Cevac MD SB1. www.ceva.us/us/Products/Product-List. (2 februari 2012)
7. KNC international. Ceva live vaccines http://knc-international.com/Products/Ceva_live_vaccines.html#9 (2 februari 2011)

8. Marek's disease virus or MDV by Poultry Cooperative Research Centre (CRC) (2010). www.poultryhub.org/bird-health-and-disease/marek%E2%80%99s-disease-virus-or-mdv/ (2 februari 2012)
9. European Commission (2002). Summary of Community decisions on marketing authorisations in respect of medicinal products from 15 July 2002 to 15 August 2002. Official Journal of the European Communities 206;5
10. COGEM (2002). Veldproeven in het kader van een diergeneeskundig onderzoek naar de veiligheid en effectiviteit van een gecombineerd vaccine tegen pseudovogelpest, dat zal worden toegepast op slachtkuikens van kippen. Advies CGM/020318-04.
11. COGEM (2003). Classificatie van geattenueerde pokkenvirusstammen. COGEM advies CGM/030922-04
12. Wernery U & Kaaden O-R (2002). Infectious diseases in camelids. Second ed., Blackwell wiss-verlag, Berlin
13. Rebhun *et al.* (1988). An epizootic of blindness and encephalitis associated with a herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and lamas. *J Am Vet Med Ass* 192:935-936
14. House JA *et al.* (1991). Experimental equine herpesvirus-1 infection in llamas (*Lama glama*). *J Vet Diagn Invest* 3:137-143