

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 06 december 2013
KENMERK CGM/131206-01
ONDERWERP Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd markervaccin tegen klassieke varkenspest

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag met de titel 'Productie en evaluatie van het klassieke varkenspest C-DIVA vaccin' van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een aanvraag voor inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-), levend vaccin (C-DIVA markervaccin) tegen de klassieke varkenspest. De werkzaamheden betreffen laboratoriumwerkzaamheden, evenals werkzaamheden in associatie met proefdieren.

De klassieke varkenspest is een zeer besmettelijke en ernstige ziekte bij varkens die grote economische schade kan veroorzaken. De ziekte wordt veroorzaakt door het *Classical swine fever virus* (CSFV).

De C-DIVA vaccinstam is een gg-variant van de zogenoemde Cedipest stam die in de jaren tachtig op de Nederlandse markt is verkocht. De Cedipest stam is op zijn beurt weer afgeleid van de geattenueerde 'Chinese' (C) stam. Het C-DIVA virus heeft enkele genetische wijzigingen in genen coderend voor oppervlakte eiwitten, waardoor het mogelijk is om gevaccineerde dieren te onderscheiden van geïnfecteerde dieren.

De C-DIVA stam geeft geen ziekteverschijnselen in gevaccineerde dieren, ook niet wanneer het vaccin in hoge dosis wordt toegediend. Uit studies is gebleken dat de oorspronkelijke C stam niet revertteert naar wild type. In het onwaarschijnlijke geval dat er reversie in de C-DIVA stam optreedt, dan zal dit zijn naar de oorspronkelijke geattenueerde Cedipest stam. Op basis van deze informatie is de COGEM van mening dat de laboratoriumwerkzaamheden op ML-II niveau en de handelingen in associatie met proefdieren op DM-II niveau ingeschaald kunnen worden met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

Onder deze inperkingsniveaus en onder navolging van de in het advies genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd markervaccin tegen klassieke varkenspest

COGEM advies CGM/131206-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een aanvraag voor inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd, levend varkenspest vaccin (C-DIVA markervaccin) van Intervet International. Het gaat hierbij zowel om laboratoriumhandelingen als werkzaamheden in associatie met varkens. De aanvrager wil de vaccinstam kweken in animale cellen en vervolgens testen in varkens. De aanvrager zal geen *challenge* experimenten met wildtype varkenspestvirussen in gevaccineerde varkens uitvoeren.

Karakteristieken van het *Classical swine fever virus*

Het *Classical swine fever virus* (CSFV) of klassieke varkenspestvirus behoort tot de familie *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*.¹ Het virus veroorzaakt bij gedomesticeerde varkens een zeer besmettelijke ziekte die grote economische schade tot gevolg kan hebben in landen met een intensieve varkenshouderij. Ook wilde zwijnen en wilde varkens zijn vatbaar voor het virus. CSFV is niet in staat om mensen te infecteren.

De ziekte kent, afhankelijk van de virulentie van de stam, een acuut, chronisch of subklinisch (nog niet waarneembaar) beloop.² De acute vorm van CSFV wordt gekarakteriseerd door hoge koorts, anorexia, meerdere oppervlakkige en interne bloedingen. Geïnfecteerde dieren sterven doorgaans binnen 10 tot 20 dagen.³ De chronische vorm wordt onder andere gekenmerkt door koorts, dufheid, grillige eetlust en diarree.² Sterfte treedt na ongeveer 3 maanden op. Bij drachtige dieren kan het virus de placenta passeren en zo een infectie veroorzaken bij de foetus. Dit kan leiden tot de geboorte van persistent geïnfecteerde biggen die het virus in hoge titers uitscheiden.³

CSFV wordt uitgescheiden in speeksel, nasale afscheiding, urine en ontlasting. Het virus kan zich zowel door direct als indirect contact verspreiden. Directe transmissie vindt vooral plaats via de oronasale route. Indirecte verspreiding kan onder andere optreden via besmette voertuigen, hokken, kleding en voedermiddelen.² Tevens kan het virus zich door de lucht verspreiden, zij het alleen over korte afstanden.²

Het virus is endemisch in Zuid- en Centraal Amerika, het Caribisch gebied en Azië. Noord-Amerika, Australië en Nieuw-Zeeland zijn vrij van de ziekte evenals de meeste landen in West- en Centraal Europa.⁴ In sporadische gevallen komen er in Europa uitbraken voor. De laatste uitbraak was in Litouwen in 2011.⁵ Indien er een nieuwe uitbraak plaatsvindt, worden er strenge maatregelen in acht genomen om de verspreiding van het virus tegen te gaan. Een van deze maatregelen betreft het ruimen van besmette en verdachte varkens. Een uitbraak in Nederland in 1997 leidde bijvoorbeeld tot de ruiming van meer dan 10 miljoen varkens.⁶

Vanwege het niet-vaccinatie beleid, dat in 1990 in de EU werd ingevoerd, is vaccinatie van varkens alleen in noodgevallen toegestaan. Met de huidige levend verzwakte vaccins is het niet mogelijk om serologisch onderscheid te maken tussen gevaccineerde dieren en dieren die geïnfecteerd zijn met wildtype CSFV. Dit leidt bij noodvaccinaties tot grote handelsbeperkingen, omdat de gevaccineerde dieren enkele jaren niet verhandeld mogen worden. Met het oog op deze restricties is er de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar zogenaamde DIVA vaccins (Differentiating Infected from Vaccinated Animals).

Genomische organisatie van CSFV

Het CSFV bevat een positief, enkelstrengs RNA genoom. Dit RNA genoom codeert voor één groot open reading frame (ORF) dat aan beide zijden geflankeerd wordt door nontranslated regions (NTRs).¹ De ORF wordt vertaald in een polyproteïne dat, als gevolg van virale en cellulaire processen, co- en posttranslationeel verwerkt wordt tot verschillende eiwitten.

Het capsid-eiwit C en de glycoproteïnen E^{ms}, E1 en E2 vormen de structurele componenten van het virusdeeltje.¹ De andere eiwitten zijn niet-structurele (NS) eiwitten, waarvan NS3, 4A, 4B, 5A en 5B nodig zijn voor RNA replicatie. Het niet-structurele eiwit p7 is waarschijnlijk betrokken bij de maturatie van het virus.¹

C-DIVA vaccinstam

De C-DIVA vaccinstam die de aanvrager wil gebruiken, is een genetisch gemodificeerde variant van de zogenoemde Cedipest stam die in de jaren tachtig onder de naam 'Suvaxyn CSF' op de Nederlandse markt is verkocht. De Cedipest stam is op zijn beurt weer afgeleid van de geattenueerde 'Chinese' (C) stam. De C-DIVA stam heeft ten opzichte van de Cedipest stam een deletie van twee aminozuren en twee adaptieve mutaties in het E2 eiwit. Daarnaast bevat het een stille adaptieve mutatie in het E^{ms} gen en een adaptieve mutatie in het E1 gen. Doordat het mutaties betreft in de C-terminale antigene domeinen van deze oppervlakte-eiwitten, is men met behulp van diagnostische testen in staat om gevaccineerde dieren te onderscheiden van geïnfecteerde dieren.

Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden in onderhavige aanvraag betreffen de productie en het gebruik van de C-DIVA vaccinstam. Het gaat hierbij zowel om laboratoriumhandelingen als werkzaamheden in associatie met dieren. Het virus wordt volgens de aanvrager gekweekt op twee 'Swine Kidney' (SK) cellijnen (SK6 en SK6.T7). Het verkregen virusmateriaal wordt getest op veiligheid en werkzaamheid door varkens te vaccineren en cellen en weefsels na infectie te testen op aanwezigheid van het virus. Er zullen volgens de aanvrager geen *challenge* experimenten plaatsvinden met wildtype CSFV in gevaccineerde dieren. Het gg-virus is door het Centraal Veterinair Instituut (CVI) in Lelystad vervaardigd.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden verschillende keren geadviseerd over CSFV. In 2006 heeft de COGEM het virus ingedeeld in klasse 4 van de dierpathogene virussen.⁷ Dit was gebaseerd op het feit dat CSFV een ernstige en erg besmettelijke ziekte is, met een grote kans op verspreiding van het virus in de dierpopulatie. Bovendien speelde bij deze classificatie mee dat het virus lang kan persistenten buiten de gastheer. In een onlangs verschenen advies heeft zij deze classificatie gehandhaafd.⁸

In 2007 heeft de COGEM geadviseerd over een aanvraag voor *in vitro* en *in vivo* laboratoriumwerkzaamheden met gg-CSFV binnen de 'High Containment Unit' (HCU) van het CVI te Lelystad.⁹ Op basis van de classificatie van het CSFV en de specifieke situatie in de HCU was de COGEM van mening dat de voorgenomen werkzaamheden, onder navolging van enkele aanvullende voorschriften, op respectievelijk ML-III en DM-III inperkingsniveau uitgevoerd konden worden.

Overweging en advies

De C-DIVA stam is een gg-variant van de Cedipest stam die op zijn beurt weer is afgeleid van de 'Chinese' (C) stam. Deze C-stam is geattenuerd door herhaalde passage in konijnen en celkweek.¹⁰

De C-stam wordt gezien als gouden standaard voor de beheersing van CSFV.¹⁰ Onderzoek heeft uitgewezen dat vaccinatie met deze stam volledige bescherming biedt tegen CSFV.¹¹ De stam veroorzaakt geen ziekte in jonge biggen en drachtige zeugen, zelfs wanneer de afweer onderdrukt wordt met behulp van corticosteroiden.¹¹ Het virus kan soms via direct contact overgedragen worden naar andere varkens, maar persisteert niet in de populatie.¹¹ Er zijn uit seriële transmissiestudies geen aanwijzingen voortgekomen waaruit blijkt dat de vaccinstam terugkeert naar de virulentie van het wildtype. Er zijn ook geen nadelige effecten aangetroffen als gevolg van de overdracht van het virus naar foetussen of pasgeboren biggen.¹¹

Door verdere adaptatie van de C-stam aan suspensieculturen van de 'Swine Kidney' (SK) cellijn is de Cedipest stam ontstaan.¹² Ten opzichte van de Cedipest stam heeft de C-DIVA stam in onderhavige aanvraag een deletie van twee aminozuren en twee adaptieve mutaties in het E2 eiwit. Daarnaast bevat het een stille adaptieve mutatie in het E^{ms} gen en een adaptieve mutatie in het E1 gen.

Uit recent onderzoek naar de werkzaamheid van de C-DIVA stam is gebleken dat varkens geen ziekteverschijnselen ontwikkelen na innoculatie met een dosis die honderd keer hoger is (10^5 TICD) dan de dosis die men voor vaccinatiedoeleinden voor ogen heeft (10^3 TICD).¹³ Na *challenge* met de zeer virulente Brescia-stam, ontwikkelden alle gevaccineerde varkens gedurende drie tot zes dagen koorts en milde klinische symptomen, maar herstelden uiteindelijk allemaal.¹³

Uit bovenstaande studies is gebleken dat de C-DIVA stam geen ziekteverschijnselen veroorzaakt in gevaccineerde dieren, ook niet wanneer het vaccin in hoge dosis wordt toegediend. Tevens is gebleken dat de oorspronkelijke C stam niet revertteert naar wild type. In het onwaarschijnlijke geval dat er reversie in de C-DIVA stam optreedt, dan zal dit zijn naar de oorspronkelijke geattenueerde Cedipest stam. Op basis van deze informatie is de COGEM van mening dat de productie van het gg-virus en de handelingen met cellen en weefsels van dieren die gevaccineerd zijn met het gg-virus op ML-II niveau uitgevoerd kunnen worden met inbegrip van de volgende aanvullende voorschriften:

- Het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse-II uitgevoerd te worden

Verder is de COGEM van mening dat handelingen met proefdieren in associatie met het gg-vaccin op DM-II uitgevoerd kunnen worden onder toepassing van de volgende aanvullende voorschriften:

- Het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht
- Er dient apart schoeisel te worden gedragen. Dit schoeisel dient na afloop van de werkzaamheden in de werkruime achtergelaten te worden.

Onder deze inperkingsniveaus en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Wang LF *et al.* (2012). Family Flaviviridae. In: Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Edited by: King AMQ *et al.* San Diego, Elsevier Academic Press: 1010-1014
2. OIE (World Organisation For Animal Health). Classical swine fever (hog cholera). <http://bit.ly/1fLs5EQ> (PDF)
3. The Merck Veterinary Manual. Overview of Classical Swine Fever. <http://bit.ly/10LkxHa>
4. Penrith ML *et al.* (2011). Classical swine fever (Hog Cholera): Review of aspects relevant to control. *Transbound Emerg Dis.* 58(3): 187-96
5. Department for Environment, Food and Rural Affairs. Classical Swine Fever in domestic pigs in Lithuania. <http://bit.ly/18K62u6> (PDF)
6. <http://www.csfvaccine.org/>
7. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
8. COGEM (2013). Advies 'Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen.' COGEM advies CGM/131031-02
9. COGEM (2007). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Hog cholera virus (varkenspestvirus) en Bovine viral diarrhoea virus. COGEM advies CGM/070626-03
10. Kortekaas J *et al.* (2010). Rational design of a classical swine fever C-strain vaccine virus that enables the

- differentiation between infected and vaccinated animals. *J Virol Methods* 163(2): 175-85
11. Van Oirschot JT (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96: 367-384
 12. Terpstra C *et al* (1990). Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 97: 77-9
 13. Kortekaas J *et al.* (2011) Protective efficacy of a Classical swine fever virus C-strain deletion mutant and ability to differentiate infected from vaccinated animals. *Vet Microbiol.* 147: 11-18