

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

DATUM 04 april 2014
KENMERK CGM/140404-01
ONDERWERP Advies 'uitwisseling van de oppervlakte eiwitten tussen aviaire paramyxovirussen'

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 98-115 met de titel 'Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken' van Intervet International bv te Boxmeer deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om de werkzaamheden met een vaccinstam van het *Newcastle disease virus* (NDV, *Avian paramyxovirus* type 1 (APMV-1)) in te schalen. De aanvrager is voornemens de oppervlakte eiwitten HN en F van de NDV vaccinstam Clone-30 te vervangen door de HN en F eiwitten van respectievelijk APMV-3, -6 en -8. Infectie met virulente stammen van NDV veroorzaken een hoge mortaliteit in pluimvee. APMV-3, -6 en -8 veroorzaken ziekte bij vogels.

De COGEM is van mening dat de genetisch gemodificeerde (gg-) NDVs door uitwisseling van de oppervlakte eiwitten met APMV-3, -6 en -8 niet virulenter zullen zijn dan APMV-3, -6 en -8. De COGEM adviseert om de kloneringswerkzaamheden in te schalen op ML-I en de *in vitro* werkzaamheden met gg-NDV en analyse van de cellen en weefsels afkomstig van geïnfecteerde proefdieren in te schalen op ML-II. De COGEM adviseert aanvullende voorschriften bij de voorgenomen dierexperimenten op DM-III te hanteren. Omdat zowel de gebruikte NDV stam als de APMV's via aerosolen overgedragen kunnen worden, acht de COGEM aanvullende voorschriften noodzakelijk om verspreiding van de gg-virussen te voorkomen.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder het genoemde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-NDV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Uitwisseling van de oppervlakte eiwitten F en HN tussen aviaire paramyxovirussen

COGEM advies CGM/140404-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 98-115 met de titel 'Genetische modificatie van enkelstrengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken' van Intervet International bv te Boxmeer. Hierbij gaat het zowel om laboratoriumhandelingen als om werkzaamheden in associatie met proefdieren. De aanvrager is voornemens de F en HN oppervlakte eiwitten van een vaccinstam van *Newcastle disease virus* (NDV) (ofwel *Avian paramyxovirus 1*, APMV-1) vervangen door de F en HN eiwitten van APMV-3, -6 en -8, teneinde chimere virale vectoren te ontwikkelen die als basis kunnen dienen voor het ontwikkelen van andere aviaire virale vaccins

Aviaire paramyxovirussen

Kenmerken van het virus

NDV of *Avian paramyxovirus type 1* (APMV-1) is de veroorzaker van pseudovogelpest of *Newcastle disease* in pluimvee. Afhankelijk van de virulentie en het weefseltropisme van NDV worden drie groepen onderscheiden. De velogene (virulente) stammen veroorzaken een ernstige ziekte gepaard gaande met grote sterfte. Mesogene stammen veroorzaken luchtweginfecties en neurologische verschijnselen en hebben een lage mortaliteit. Lentogene stammen veroorzaken een milde infectie van de luchtwegen of asymptomatische infecties. Kippen zijn vatbaarder voor NDV dan eenden of ganzen. Wereldwijd wordt pluimvee gevaccineerd tegen NDV. De gebruikte vaccinstammen zijn afgeleid van lentogene virusstammen.

De symptomen van pseudovogelpest betreffen vooral ademhalings- en zenuwstoornissen, en zwellingen van het weefsel rond de ogen en in de nek. Het virus wordt overgedragen door direct contact met uitwerpselen van geïnfecteerde vogels, maar ook door o.a. besmet voer, strooisel, water, via kleding en aerosolen. Vooral in mest kan het virus een lange tijd infectieus blijven.¹ NDV kan ook andere diersoorten infecteren en conjunctivitis veroorzaken bij de mens.

APMV-3 stammen zijn geïsoleerd uit zowel wilde als gedomesticeerde vogels. Infectie met APMV-3 is geassocieerd met luchtweginfecties in kalkoenen, verminderde groei van jonge kippen, en encefalitis en een hoge sterfte van gekooide vogels.^{2,3} APMV-6 stammen zijn als eerste geïsoleerd uit tamme eenden. Symptomen van APMV-6 infectie bij kalkoenen zijn milde luchtwegklachten en een verminderde eiproductie.^{4,5} Een infectie met APMV-6 geeft geen ziekteverschijnselen in kippen. APMV-8 is geïsoleerd uit ganzen en eenden.⁶ Experimentele infectie van kippen en eenden met dit virus veroorzaakt geen ziekteverschijnselen.

Bij kippen op pluimveehouderijen in de Verenigde Staten zijn antilichamen tegen APMV-3, -6 en -8 gevonden.⁷ Intranasale toediening van deze virusstammen in muizen resulteerde in een infectie die

in het geval van APMV-6 leidde tot kortdurende ziekteverschijnselen en gewichtsverlies.⁸ Er zijn geen aanwijzingen in de wetenschappelijke literatuur dat AMPV-3, -6 of -8 ziektes veroorzaken bij de mens.

Opbouw van het virus

APMV behoort tot de orde *Mononegavirales*, de familie *Paramyxoviridae* en het genus *Avulavirus*.⁹ Op basis van hemagglutinatie en neuramidase inhibitie worden er 9 verschillende serotypes onderscheiden.¹⁰ Het genoom van APMV bevat zes genen die coderen voor respectievelijk het 'nucleocapside' (N), 'phospho' (P), 'matrix' (M), 'fusion' (F), 'haemagglutinin-neuraminidase' (HN) en 'large' (L) eiwit. Het nucleocapside eiwit vormt samen met het RNA genoom en het RNA-afhankelijke RNA polymerase, bestaande uit de P en L eiwitten, een zogenaamd ribonucleoproteïne complex. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De glycoproteïnes F en HN bevinden zich in het lipidemembraan en zijn verantwoordelijk voor de verankering aan, en fusie met de gastheercel. Uit wetenschappelijk onderzoek is gebleken dat het tropisme van APMV's voornamelijk bepaald wordt door de eiwitten F en HN.^{11,12,13}

Voordat nieuwgevormde virusdeeltjes infectieus zijn, moet het F eiwit in de gastheer gekliefd worden in F1 en F2.^{14,15} F eiwitten van lentogene stammen worden extracellulair gekliefd in de luchtwegen of het maagdarmkanaal, terwijl F eiwitten van mesogene en velogene stammen intracellulair gekliefd worden.^{16,17}

Eerder COGEM advies

In 2002 heeft de COGEM geadviseerd over gg-werkzaamheden met een vaccinstam die afgeleid is van de lentogene NDV stam LaSota (vaccinstam NDV Clone-30).¹⁸ In dit advies zijn de kloneringswerkzaamheden met NDV Clone-30 ingedeeld op ML-I en *in vitro* werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau. Aangezien de velogene stammen van NDV een hoge mortaliteit kunnen veroorzaken in pluimvee en dieren het virus kunnen verspreiden terwijl ze nog geen ziekteverschijnselen vertonen, heeft de COGEM in 2006 het wild-type NDV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁹ In 2013 heeft de COGEM geadviseerd om APMV 2-9 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.²⁰

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om de lentogene vaccinstam NDV Clone-30 als backbone te gebruiken voor het ontwikkelen van chimere virale vectoren die als basis kunnen dienen voor het ontwikkelen van andere aviaire virale vaccins. Hiertoe wil de aanvrager de genen F en HN van uitgangsstam Clone-30 vervangen door F en HN van APMV-3, -6 of -8. Er zullen geen combinaties van de F en HN genen van verschillende APMV's gemaakt worden.

De constructen worden gebruikt om animale cellen te infecteren en gg-virussen te produceren. Tevens wil de aanvrager de gg-virussen gebruiken om proefdieren (kip, kalkoen, eend en kwartel) te infecteren. De aanvrager geeft aan deze experimenten uit praktische overwegingen uit te willen voeren

op DM-III inperkingsniveau. De cellen en de weefsels van deze proefdieren zullen vervolgens geanalyseerd worden.

Overweging

Het velogene NDV veroorzaakt sterfte bij pluimvee en kan andere zoogdieren waaronder de mens infecteren. Dit virus is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. De lentogene vaccinstam NDV Clone-30 wordt al vele jaren in grote hoeveelheden wereldwijd als levend vaccin toegepast in de pluimveehouderij en kent een lange historie van veilig gebruik.²¹ Alle NDV stammen, waaronder ook de lentogene vaccinstam Clone-30, kunnen conjunctivitis veroorzaken bij de mens. NDV heeft een groter gastheerbereik dan APMV-3, -6 en -8.¹³ In de wetenschappelijke literatuur zijn geen aanwijzingen dat APMV-3, -6 en -8 ziekte kunnen veroorzaken bij de mens. APMV-3, -6 en -8 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

De aanvrager is voornemens om de eiwitten F en HN van NDV Clone-30 te vervangen door de F en HN eiwitten van AMPV-3, -6 of -8. Er worden geen combinaties van de F en de HN eiwitten van de verschillende virussen gemaakt. Het gastheerbereik en de virulentie van aviaire paramyxovirussen wordt voor het overgrote deel bepaald door de combinatie van F en HN eiwitten.^{11,12}

De klieving van het precursor F0-eiwit door proteases van de gastheercel waardoor het F-eiwit ontstaat, speelt een belangrijke rol bij de virulentie van NDV. Het F-eiwit van lentogene NDV's wordt extracellulair gesplitst, terwijl splitsing van de mesogene en velogene F-eiwitten intracellulair plaatsvindt.

De klievingssites van de F eiwitten van NDV verschillen. Zowel velogene als mesogene NDV stammen hebben minimaal twee paar basische residuen bij de klievingssite, terwijl de minder pathogene lentogene stammen van NDV, zoals de vaccinstam NDV Clone-30, twee enkelvoudige basische residuen hebben. APMV-3 heeft drie enkelvoudige basische residuen en APMV-6 en -8 hebben elk één enkelvoudig basisch residu in de klievingssite van het F eiwit.²² Hierdoor zijn de klievingssites van AMPV-3, -6 en -8 duidelijk verschillend van de klievingssites van de velogene en mesogene stammen van NDV.

Uitwisseling van F-eiwitten tussen virulente en niet-virulente NDV's of verandering van de klievingssites in het F-eiwit leiden in de meeste gevallen tot een veranderde virulentie. Echter dit is niet altijd het geval.¹¹ Blijkbaar spelen ook andere genen en sequenties een rol bij de virulentie en pathogeniteit. Aangetoond is dat de klievingssite van het F-eiwit van NDV Clone-30 de belangrijkste, maar niet de enige, determinant is voor de attenuatie van deze virusstam.²³ Verandering van de klievingssite leidde tot virulentie vergelijkbaar met mesogene stammen maar niet tot virulenties van velogene stammen.

Steglich *et al.* hebben aangetoond dat uitwisseling van F en HN genen van Clone-30 met de F en HN genen van APMV-8 geen aanleiding geven tot virulentieverhoging of tropisme verandering.¹³ Voor APMV-3 en -6 zijn hierover geen gegevens beschikbaar. Echter, op basis van de virulentie van

wildtype APMV-6 verwacht de COGEM niet dat er bij uitwisseling van de F en HN eiwitten virulentieverhoging zal plaatsvinden. APMV-3 veroorzaakt na NDV de meeste ziekteverschijnselen. Uitwisseling met de F en HN genen van APMV-3 zou daarom de virulentie van Clone-30 kunnen verhogen. Echter, de COGEM verwacht niet dat een dergelijk recombinant virus een hogere virulentie zal hebben dan wildtype APMV-3, dat geclassificeerd is als een klasse 2 pathogeen.

Bovenstaande in overweging nemende acht de COGEM de kans zeer klein dat bij de voorgenomen werkzaamheden een virus zal ontstaan dat virulenter is dan wildtype APMV-3, -6 en -8

Advies

Kloneren van F en HN in de NDV Clone-30 backbone

Gebaseerd op bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM om de kloneringswerkzaamheden voor het vervaardigen van de constructen uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.

In vitro werkzaamheden met gg-NDV en analyse van cellen en weefsels van proefdieren

Gezien het feit dat de lentogene vaccinstam NDV Clone-30 een lange geschiedenis van veilig gebruik kent, adviseert de COGEM de experimenten op ML-II inperkingsniveau uit te voeren. Aangezien de vaccinstam conjunctivitis kan veroorzaken en zowel de vaccinstam als de APMV's via de aerogene route (aerosolen) overgedragen kunnen worden, acht de COGEM het noodzakelijk om bij de werkzaamheden de volgende aanvullende voorschriften voor te schrijven om verspreiding van de gg-virussen te voorkomen:

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

Als aanvulling op deze voorschriften geldt voor geïnfecteerde eieren bovendien:

- 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.

Werkzaamheden in associatie met proefdieren

Volgens de Regeling ggo moeten werkzaamheden met een klasse 2 aerogeen overdraagbaar virus in associatie met grote proefdieren uitgevoerd worden op DM-III inperkingsniveau.²⁴ De COGEM adviseert bij de werkzaamheden de volgende inperkende voorschriften te hanteren om uitsleep van het virus via de medewerker te voorkomen:

- het dragen van handschoenen, een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een beschermende bril is verplicht;
- in de werkruimte moet ander schoeisel worden gedragen. Dit schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten.

Onder de gestelde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-NDV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Office International des Epizooties (OIE), Internet (31-03-2014)
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/NEWC ASTLE_DISEASE.pdf
2. Tumova B *et al.* (1979). A hitherto unreported paramyxovirus of turkeys. *Res Vet Sci.* 27: 135–140
3. Alexander DJ *et al.* (1983). Avian paramyxoviruses of PMV-3 serotype in British turkeys. *Avian Pathol.* 4:469–82
4. Chang PC *et al.* (2001). Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *J Gen Virol.* 82:2157–68
5. Alexander D & Senne D. (2008) Avian Paramyxoviruses 2-9. *Diseases of Poultry*
6. Yamane N *et al.* (1982). Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature. *Microbiol Immunol* 26(7):557–68
7. Warke A *et al.* (2008). Prevalence of antibodies to different avian paramyxoviruses in commercial poultry in the United States. *Avian Dis.* 52 (4):694–7
8. Khattar SK *et al.* (2011). Experimental infection of mice with avian paramyxovirus serotypes 1 to 9. *PLoS One* 6(2):e16776
9. King AMQ *et al.* (editors) (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego, Elsevier Academic Press
10. Alexander DJ (2003) Avian paramyxoviruses 2–9; Saif YM eDoPISUPAp, editor. Ames: Iowa State University Press.
11. Dortmans JC *et al.* (2011). Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res.* 42:122. doi: 10.1186/1297-9716-42-122
12. Kim SH *et al.* (2011). Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses. *J Virol.* 85(17):8582-96
13. Steglich C *et al.* (2013). Chimeric newcastle disease virus protects chickens against avian influenza in the presence of maternally derived NDV immunity. *PLoS One* 8(9):e72530. doi: 10.1371/journal.pone.0072530. eCollection 2013
14. Rott R & Klenk HD. (1988). Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In: Newcastle disease. Alexander DJ, editor. Boston: Kluwer Academic Publishers; pp. 98–112
15. Garten W *et al.* (1980). Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J Gen Virol.* 50:135–147. doi: 10.1099/0022-1317-50-1-135
16. Nagai Y *et al.* (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology.* 72:494–508. doi: 10.1016/0042-6822(76)90178-1
17. Glickman RL *et al.* (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol.* 62:354–356

18. COGEM (2002). Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken. COGEM advies CGM/020318-06
19. COGEM (2006). Advies dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
20. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02
21. De Boer GF *et al.* (1994). Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathol.* 23(2):263-75
22. Samuel AS *et al.* (2010). Complete genome sequence of avian paramyxovirus (APMV) serotype 5 completes the analysis of nine APMV serotypes and reveals the longest APMV genome. *PLoS One.* 2010 Feb 17;5(2):e9269. doi: 10.1371/journal.pone.0009269
23. Römer-Oberdörfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T en Mettenleiter TC (2003). Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J. Gen. Virol* 84: 3121-3129
24. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004