

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

DATUM 16 april 2015
KENMERK CGM/150416-01
ONDERWERP Advies Classificatie van *Equid herpesvirus 1*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel ‘*Onderzoek naar geschiktheid van een Equine Herpesvirus type 1 vector als veterinaire vaccin*’ van Boehringer Ingelheim Animal Health Operations B.V., deelt de COGEM u het volgende mee

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van *Equid herpesvirus 1* (EHV-1). De aanvrager wil expressie-experimenten uitvoeren in dierlijke cellen met een EHV-1 vaccinvector waarin een aantal genen van het *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) zijn geïntroduceerd. De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van deze werkzaamheden.

EHV-1 is ziekteverwekkend voor paarden en komt algemeen voor in paardenpopulaties wereldwijd. Een infectie kan ongemerkt verlopen of tot verkoudheidssymptomen leiden. In sommige gevallen kan een infectie leiden tot abortus of een neurologische aandoening. Het virus verspreidt zich via direct of indirect contact en via aerogene transmissie (over enkele meters). Het virus persisteert beperkt buiten de gastheer en in Nederland zijn er diverse vaccins verkrijgbaar die beschermen tegen respiratoire verschijnselen. Op basis van deze argumenten is de COGEM van mening dat het EHV-1 een strikt dierpathogeen virus van klasse 2 is.

De gg-EHV-1 vector is gebaseerd op de RacH vaccinstam. De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat het gg-EHV-1 door de aanwezigheid van de FMDV sequenties een verhoogde pathogeniteit zal hebben ten opzichte van het wild-type virus. Op basis van de classificatie van EHV-1 in pathogeniteitsklasse 2, de aard van de RacH vaccinstam en de functie van de P1, 2A en 3C eiwitten in associatie met de vaccinstam, adviseert de COGEM de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Onder genoemd inperkingsniveau is de COGEM van mening dat de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-EHV-1 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. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie van *Equid herpesvirus 1*

COGEM advies CGM/150416-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Equid herpesvirus 1* (EHV-1) en de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)EHV-1. De aanvrager wil expressie-experimenten uitvoeren in animale cellen met de EHV-1 vaccinstam RacH waarin de P1, 2A en 3C genen van het *Foot-and-mouth disease virus* (serotype O) zijn geïntroduceerd. De aanvrager wil onderzoek doen naar de geschiktheid van de EHV-1 vector als veterinair vaccin tegen Mond-en-klauwzeer (MKZ).

Equid herpesvirus 1 (EHV-1)

EHV-1 behoort tot de familie *Herpesviridae*, de subfamilie *Alphaherpesvirinae* en het genus *Varicellovirus*.¹ Het virus heeft een lineair dubbelstrengs DNA genoom van ongeveer 150 kb groot dat zich bevindt in een eiwitmantel. Deze eiwitmantel wordt omgeven door een lipide membraan.¹

EHV-1 infecteert de bovenste luchtwegen van paarden en het virus komt algemeen voor in paardenpopulaties wereldwijd.² Een infectie kan onopgemerkt verlopen (subklinische infectie) of gepaard gaan met ziekteverschijnselen zoals koorts, neusuitvloeiing, ooguitvloeiing, sloomheid, anorexie en conjunctivitis.^{2,3,4} De primaire infectie met EHV-1 vindt vermoedelijk plaats in de eerste weken of maanden van het leven van een veulen, waarna het virus in ongeveer tachtig procent van de gevallen latent aanwezig blijft.⁵

Na een infectie dringt EHV-1 via witte bloedcellen door in de onderliggende weefsels en vervolgens in de lymfeknopen van het ademhalingsapparaat. Het virus wordt door cel-gebonden viremie naar andere delen van het lichaam verplaatst, waarbij het in het endotheel van de baarmoeder en het centraal zenuwstelsel kan belanden.^{2,4,6} Wanneer het virus zich vermenigvuldigt in de vasculatuur van de baarmoeder kan dit bij drachtige merries leiden tot EHV-1 geïnduceerde abortus.² Indien het virus zich vermenigvuldigt in het centraal zenuwstelsel kan dit leiden tot een neurologische aandoening genaamd *equine herpes myeloencephalopathy* (EHM).^{2,4} EHM wordt geassocieerd met een EHV-1 stam die een puntmutatie in het DNA-polymerase gen bevat. Hierdoor zit er een asparaginezuur (D) in plaats van asparagine (N) op positie 752 van het DNA-polymerase.²

Verspreiding van het virus gebeurt via direct of indirect contact met besmette nasale afscheidingen, geaborteerde foetussen, placenta's of placentavloeistoffen en gebruiksvoorwerpen.^{2,3} In Nederland zijn er diverse geïnactiveerde EHV-1 vaccins verkrijgbaar met een bewezen effectiviteit voor respiratoire symptomen.^{3,4} Op dit moment zijn er wereldwijd geen vaccins beschikbaar die volledige bescherming bieden tegen de abortus en/of neurologische vorm van EHV-1.³

Foot-and-mouth disease virus (FMDV)

Het FMDV behoort tot de familie *Picornaviridae*, genus *Aphthovirus*. Het virus infecteert herkauwers en varkens en kan via zowel indirect als direct contact overgedragen worden. Het ziektebeeld kan zeer ernstig zijn en bestaat uit blaarvorming in de mondholte en aan de hoeven,

uiers of snuiten. Jonge dieren kunnen aan de infectie sterven. FMDV is één van de meest besmettelijke diervirussen ter wereld en is door de COGEM geclassificeerd als een dierpathogeen van klasse 4.⁷

Het FMDV heeft een positief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 8500 nucleotiden lang. Het genoom wordt afgelezen als een groot polypeptide. Na translatie worden er in eerste instantie vier primaire eiwitten gevormd genaamd L^{pro}, P1-2A, P2 en P3. L^{pro} zorgt voor inhibitie van de eiwitsynthese in de gastheercel door klieving van de translatie initiatie factor eIF4G. De P1-2A precursor eiwitten worden door het 3C protease (3C^{pro} afkomstig van P3) omgezet in de capsid-eiwitten VP0, VP1 en VP3. Tijdens de verpakking van het genoom wordt VP0 verder omgezet in de capsid-eiwitten VP2 en VP4. De VP1, VP2 en VP3 eiwitten zitten aan de buitenkant van het virusdeeltje en dragen bij aan de antigene eigenschappen van het virus. De niet-structurele eiwitten afkomstig van de P2 en P3 precursors zijn betrokken bij de eiwitklieving (3C^{pro}) en genoomrelicatie (2B, 2C, 3A, 3B₁₋₃ (VPg) en 3D^{pol}).⁸

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil expressie-experimenten uitvoeren in animale cellen met de EHV-1 vaccinstam RacH waarin de P1, 2A en 3C genen van het FMDV zijn geïntroduceerd. Expressie van deze genen staat onder controle van de *Humaan cytomegalovirus (HCMV) immediate early promoter*. Tijdens translatie zorgt het 2A eiwit voor vrijgave van het 3C protease dat op zijn beurt het P1 eiwit klieft in VP0, VP1 en VP3. De structurele eiwitten assembleren zich spontaan tot lege virusdeeltjes.

Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. 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 ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie

verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

De COGEM baseert zich bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen hoofdzakelijk op vier elementen: het ziekmakende potentieel, de enzoötische aanwezigheid, het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme en de mogelijkheden om verspreiding in te perken.⁹ Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.⁹

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over EHV-1. Wel heeft de COGEM geadviseerd over herpesvirussen die tot hetzelfde genus behoren, waaronder *Bovine herpesvirus 1*, *Felid herpesvirus 1* en *Human herpesvirus 3*. Deze virussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁰ Het *Suid herpesvirus 1* is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁰ In 2012 heeft de COGEM het FMDV geclassificeerd als een dierpathogeen van klasse 4.⁷

Classificaties wereldwijd

EHV-1 wordt in de Duitse *Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 462* ingedeeld in *Risikogruppe 1*.¹¹ In België is het EHV-1 door het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹² Het Franse *Haut Conseil des biotechnologies* heeft EHV-1 ingedeeld in *Classe Ea1*.¹³ Deze klasse komt overeen met pathogeniteitsklasse 2 in Nederland. Het Zwitserse *Federal Office for the Environment (FOEN)* beschouwt EHV-1 als een klasse 2 dierpathogeen.¹⁴ De Amerikaanse ATCC heeft EHV-1 ingedeeld in *Biosafety Level 2*.

Overweging en advies

Classificatie van EHV-1

Het EHV-1 is ziekteverwekkend voor paarden. Er zijn geen aanwijzingen dat het virus ziekteverwekkend is voor de mens. Het virus is algemeen aanwezig in paardenpopulaties wereldwijd en veroorzaakt bij paarden een aandoening met drie klinische verschijningsvormen: de respiratoire vorm (verkoudheidssymptomen), de abortusvorm en de neurologische vorm.⁴ Afgezien van verworpen foetussen door EHV-1 geïnduceerde abortussen en incidenteel voorkomende neurologische gevallen, is de mortaliteit van een EHV-1 infectie gering. Het virus verspreidt zich

via direct of indirect contact en via aerogene transmissie (over korte afstanden van enkele meters). Vectoren spelen geen rol in de transmissie en het virus persisteert beperkt buiten de gastheer. In Nederland zijn er diverse vaccins verkrijgbaar die goed beschermen tegen respiratoire verschijnselen, maar niet tegen infectie.⁴ Op basis van deze argumenten is de COGEM van mening dat het EHV-1 een strikt dierpathogeen virus van klasse 2 is.

gg-EHV-1

Het gg-EHV-1 dat de aanvrager in dierlijke cellen wil transfacteren, is gebaseerd op de RacH vaccinstam. Deze stam wordt onder andere toegepast als *modified live virus* vaccin tegen EHV-1 in Noord-Amerika en wordt niet geassocieerd met ziekteverschijnselen in paarden.^{5,15} RacH is geattenuëerd ten opzichte van het wild-type isolaat RacL11 door 265 passages over *primary swine kidney cells*.¹⁶ Deze attenuatie is voornamelijk het gevolg van de deletie van beide kopieën van het zogenoemde *IR6* gen. Het IR6 eiwit vergemakkelijkt onder meer het uittreden van virusdeeltjes uit de celkern van een geïnfecteerde cel en wordt gezien als belangrijke virulentiefactor.¹⁵

In het gg-EHV-1 zijn de P1, 2A en 3C genen van het FMDV geïntroduceerd. De P1, 2A en 3C eiwitten zijn betrokken bij de formatie van lege virusdeeltjes en hebben geen virulentie-eigenschappen. Ook hebben zij geen functie in de replicatie van het virus of de vorming van infectieuze virusdeeltjes. De COGEM ziet geen reden om aan te nemen dat het gg-EHV-1 door de aanwezigheid de P1, 2A en 3C sequenties, een verhoogde pathogeniteit zal hebben ten opzichte van het wild-type virus. De COGEM merkt op dat uit de aangeleverde informatie niet duidelijk blijkt op welke locatie de FMDV-sequenties in het genoom van RacH zijn geïnsereerd.

Conclusie

Op basis van de classificatie van EHV-1 als een strikt dierpathogeen van klasse 2, de aard van de RacH vaccinstam en de functie van de P1, 2A en 3C eiwitten in associatie met de vaccinstam, adviseert de COGEM de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Onder genoemd inperkingsniveau is de COGEM van mening dat de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-EHV-1 voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Additionele opmerking

In de nieuwe Regeling ggo worden er twee procedures onderscheiden voor werkzaamheden op inperkingsniveau II. Voor activiteiten die zijn ingeschaald op II-v moet een vergunning worden aangevraagd. Voor activiteiten die zijn ingeschaald op II-k geldt een kennisgevingsprocedure.

De COGEM is van mening dat inperkingsniveau ML-II-v van toepassing is op niet biologisch ingeperkte chimere virussen die zijn samengesteld uit klasse 2 virussen waarvan er minimaal één een humaan virus is. Het EHV-1 en het FMDV zijn strikt dierpathogene virussen van respectievelijk klasse 2 en klasse 4. Daarbij is het de vraag in hoeverre de EHV-1 vector die enkele eiwitten van het FMDV tot expressie brengt als een chimeer virus beschouwd moet worden. Deze eiwitten hebben geen effect op de pathogeniteit van de vector.

Alles in overweging nemende is de COGEM van mening dat de ML-II-k procedure op deze aanvraag van toepassing is.

Referenties

1. Pellett PE *et al.* (2012). The Double Standed DNA viruses, Order *Herpesvirales*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
2. Lunn DP *et al.* (2009). Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 23: 450-461
3. Universiteit Utrecht, Veterinaire Service en Samenwerking. Rhinopneumonie. <http://bit.ly/1DLTrb9> (bezocht: 9 april 2015)
4. Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde (2015). Richtlijn Rhinopneumonie bij het paard versie 1.0.
5. Kydd JH *et al.* (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 15-30
6. Ma G *et al.* (2013). Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol* 167: 123-134
7. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
8. Jamal SM & Belsham GJ (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44: 116
9. COGEM (2014). Signalering Criteria classificatie dierpathogenen. COGEM advies CGM/141013-02
10. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene DNA virussen. COGEM advies CGM/130917-01
11. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA) (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462). www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672902/publicationFile/48593/TRBA-462.pdf (bezocht: 8 april 2015)
12. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezocht: 8 april 2015)
13. Haut Conseil des biotechnologies (2013). Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'Organismes Génétiquement Modifiés. www.hautconseildesbiotechnologies.fr/IMG/pdf/Manuel_HCB_utilisation_confinee_OGM.pdf (bezocht: 8 april 2015)
14. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013 www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezocht: 8 april 2015)
15. Rosas CT *et al.* (2006). Equine herpesvirus type 1 modified live virus vaccines: quo vaditis? *Expert Rev Vaccines* 5: 119-131
16. Rosas CT *et al.* (2007). Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV). *Virus Res* 125: 69-78