

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

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 18 mei 2015
KENMERK CGM/150518-02
ONDERWERP Advies Omlaagschaling werkzaamheden met gg-*Rift Valley fever virus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley Fever Virus*', afkomstig van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (gg-RVFFV). RVFFV veroorzaakt in schapen en muizen een ernstige ziekte. Een RVFFV infectie leidt ook in een beperkt deel van de humane populatie tot ziekte. Onder dieren wordt RVFFV voornamelijk verspreid door muggen. Infectie van mensen vindt met name plaats na direct of indirect contact met bloed of weefsels van geïnfecteerde dieren. Er is geen verspreiding van mens op mens beschreven. Op basis van genoemde eigenschappen heeft de COGEM *wildtype* RVFFV in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld.

De aanvrager wil voor zijn onderzoek gebruik maken van gg-RVFFV. In deze variant is het virusgenoom verdeeld over vier genoomsegmenten in plaats van drie. Tevens is een belangrijke virulentiefactor uit het genoom verwijderd. Wetenschappelijk onderzoek heeft uitgewezen dat de verwijdering van de virulentie factor de pathogeniteit van RVFFV in verschillende diermodellen vermindert. Ook de opsplitsing van het virusgenoom over vier genoomsegmenten leidt tot verzwakking van het virus.

Vanwege de combinatie van beide verzwakkende modificaties en de beperkte verspreidingsmogelijkheden van RVFFV in een laboratorium adviseert de COGEM de *in vitro* werkzaamheden met gg-RVFFV op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Voor de *in vivo* werkzaamheden in muizen, schapen en runderen adviseert zij het DM-II inperkingsniveau. Om de kans op infectie van de medewerker te minimaliseren adviseert zij daarbij enkele aanvullende voorschriften te hanteren. Op deze inperkingsniveau's en onder navolging van de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's van voorgenomen werkzaamheden met gg-RVFFV 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
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, 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

Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*

COGEM advies CGM/150518-02

Inleiding

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over een verzoek tot wijziging van de vergunning getiteld ‘Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus*’ (IG 07-150) van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van het Wageningen UR. De aanvrager wil gaan werken met een genetisch gemodificeerde (gg-) *Rift Valley fever virus* waaruit het gen coderend voor het eiwit NSs is verwijderd en waarvan het M-genoomsegment in twee genoomsegmenten is opgesplitst. Hij verzoekt de werkzaamheden met dit zogenaamde gg-RVFFV-4S-ΔNS op ML-II en DM-II inperkingsniveau uit te mogen voeren.

Rift Valley fever virus

Het *Rift Valley fever virus* (RVFFV) is voor het eerst in 1931 geïdentificeerd bij schapen in de Rift vallei in Kenia. Inmiddels is bekend dat het virus endemisch is in verschillende Afrikaanse landen. In 2000 heeft het virus zich ook in enkele Arabische landen gemanifesteerd. RVFFV is primair infectieus voor landbouwhuisdieren (schapen, geiten, koeien en kamelen) wat kan leiden tot grote economische schade. Tevens kan het virus mensen infecteren.^{1,2,3}

Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen zoals koorts, hoofdpijn en spierpijn. Een klein deel van de patiënten (1%) ontwikkelt ernstigere verschijnselen zoals oogontsteking, hemorrhagische koorts of hersen- en ruggenmergontsteking.^{1,2} Bij dieren zijn in het bijzonder schapen vatbaar voor het virus. De mortaliteit onder volwassen schapen ten gevolge van een infectie met het RVFFV is ca. 10%. Bij lammeren overlijdt 90% aan de gevolgen van een RVFFV infectie. Als drachtige schapen worden geïnfecteerd is de kans op abortus bijna 100%.^{1,2}

Bij dieren wordt het virus voornamelijk verspreid door verschillende muggensoorten.^{1,3} In dierexperimenteel onderzoek is aangetoond dat horizontale overdracht van RVFFV tussen schapen ook zonder tussenkomst van vectoren mogelijk is. De schapen bleken het virus via hun neus en oren uit te scheiden.⁴ Onder mensen vindt besmetting voornamelijk plaats via direct of indirect contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren.^{1,2,3} Ook inhalatie van aërosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden heeft geresulteerd in humane infecties.² Tevens zijn humane infecties door muggenbeten gerapporteerd.^{2,3} Tot op heden is het niet waargenomen dat het virus rechtstreeks van mens tot mens wordt overgedragen.^{2,3}

Genomische organisatie van RVFFV

RVFFV is een negatief-strengig RNA virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie *Bunyaviridae*. Het genoom bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment.⁵ Het S-genoomsegment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met

de RNA genoomsegmenten het zogenaamde ‘nucleocapside’. Daarnaast codeert het S-genoomsegment voor het niet-structurele eiwit NSs dat onder andere betrokken is bij het onderdrukken van interferon-beta productie. Dit eiwit is niet essentieel voor de levensvatbaarheid van het virus, maar speelt een belangrijke rol bij de virulentie van het RVFV.^{6,7,8,9,10,11} Het M-genoomsegment codeert voor het glycoproteïne voorloperewit GPC dat na translatie gekleefd wordt in Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden. Deze interactie faciliteert de opname van het virus in de cel. Het L-genoomsegment codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese. De eiwitten L en N zijn essentieel voor RVFV replicatie.

Aan de 5’ en 3’ uiteinden van de genoomsegmenten van RVFV bevinden zich sequenties, die niet coderen voor een eiwit: de zogenaamde ‘untranslated regions’ of UTRs. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTRs verschillend in lengte en nucleotide volgorde. De UTRs zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil RVFV-4S- Δ NSs virusdeeltjes produceren en hiermee vervolgens animale cellen infecteren. Daarnaast is de aanvrager voornemens muizen, schapen en runderen te infecteren met de RVFV-4S- Δ NSs deeltjes en handelingen met cellen en weefsels afkomstig van deze dieren uit te voeren.

Voor de experimenten wil de aanvrager gebruik maken van twee RVFV-4S- Δ NS varianten. De eerste is gebaseerd op het zogenaamde 35/74 RVFV isolaat, de tweede op het Clone 13 vaccin virus. In het genoom van RVFV-4S- Δ NSs is het M segment gesplitst in twee aparte genoomsegmenten, waardoor het deeltje in totaal vier genoomsegmenten bevat. Daarnaast is het gen voor de virulentiefactor NSs uit het genoom verwijderd. Voor de RVFV-4S- Δ NSs mutant die gebaseerd is op het 35/74 isolaat is het gehele NSs gen gedeleteerd, voor de RVFV-4S- Δ NSs mutant gebaseerd op Clone 13 is 69% van het NSs gen gedeleteerd.

De aanvrager is van mening dat het RVFV-4S- Δ NS geattenuerd is ten opzichte van het uitgangsvirus en verzoekt om de werkzaamheden op ML-II en DM-II inperkingsniveau uit te mogen voeren. De aanvrager is voornemens handelingen met gg-RVFV-4S- Δ NSs deeltjes in associatie met dieren buiten het veiligheidskabinet uit te voeren, waarbij de medewerkers beschermende kleding, handschoenen, een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een beschermende bril zullen dragen. De aanvrager geeft aan dat uitsleep wordt voorkomen door na decontaminatie de kleding in de dierruimte achter te laten en te douchen.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden drie keer geadviseerd over werkzaamheden met gg-RVFV.^{12,13,14} In haar eerste advies heeft de COGEM aangegeven RVFV in pathogeniteitsklasse 3 in te delen. Op basis van deze classificatie adviseerde zij *in vitro* handelingen met volvirulent gg-RVFV op ML-III inperkingsniveau en dierexperimenten op DM-III niveau in te schalen. Tweemaal was de COGEM van mening dat de voorgenomen *in vitro* experimenten met gg-RVFV op ML-II niveau uitgevoerd kon worden zonder dat de veiligheid voor mens en milieu in het gevaar kwam. Als voorwaarde aan deze

omlaagschalingen stelt de COGEM dat er tijdens de werkzaamheden geen autonoom replicerende, vol-virulente, infectieuze deeltjes gevormd worden. Hieraan werd volgens de COGEM voldaan bij werkzaamheden waarbij slechts twee van de drie volledige of onvolledige genoomsegmenten tegelijkertijd werden geproduceerd en bij werkzaamheden waarbij infectieuze, replicatie-defectieve RVFV deeltjes werden geproduceerd door co-transfectie van het L- en het S-genoomsegment, een expressieplasmide met de coderende sequentie van de genen die op het M-genoomsegment liggen en een minigenoom dat een transgen van interesse en de UTR's van het S-genoomsegment bevat.^{12,14} De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de omlaagschaling van dierexperimenten met gg-RVFV.

Overweging

Pathogeniteit gg-RVFV

RVFV veroorzaakt met name in schapen een ernstige ziekte die bij deze dieren kan leiden tot een hoge mortaliteit. In een beperkt deel van de humane populatie kan dit virus ook een ernstige ziekte veroorzaken. De mortaliteit in de mens is gering. Op basis van de ernst van de ziekte in dieren, het zoönotische potentieel, de verschillende transmissieroutes en het feit dat er geen effectieve behandeling of vaccin voor handen is, heeft de COGEM in 2008 geadviseerd RVFV in pathogeniteitsklasse 3 in te delen. Dientengevolge worden *in vitro* en *in vivo* laboratoriumwerkzaamheden met gg-RVFV standaard op resp. ML-III en DM-III inperkingsniveau ingedeeld. Indien het betreffende gg-RVFV een autonoom replicerend, vol-virulent virus is, acht de COGEM deze inschaling van toepassing.

De aanvrager wil in dit geval gebruik maken van gg-RVFV varianten waaruit het gen, dat codeert voor de virulentiefactor NSs is verwijderd en waarvan het M-genoomsegment in twee segmenten is opgedeeld. Uit *in vitro* experimenten blijkt dat deze varianten in staat zijn zich te repliceren op zowel humane als animale cellijnen. De replicatie-efficiëntie lijkt evenwel verminderd. De aanvrager veronderstelt dat dit het gevolg is van het feit dat dit ggo uit vier in plaats van de gebruikelijke drie genoomsegmenten bestaat, wat een negatieve invloed heeft op de packaging-efficiëntie.

Verschillende wetenschappelijke studies hebben laten zien dat de deletie van het gen dat codeert voor NSs resulteert in virussen die avirulent zijn in muizen, schapen en runderen.^{8,10,11} In Zuid-Afrika is sinds 2010 een veterinair vaccin op de markt dat gebaseerd is op Clone 13. Dit is dezelfde RVFV stam waarop ook een van de gg-RVFV varianten is gebaseerd. De studies die over Clone 13 zijn gepubliceerd, hebben geen veiligheidsproblemen aan het licht gebracht.^{10,11}

In een experiment waarin het M-genoomsegment verdeeld is over twee segmenten maar het NSs aanwezig is, laat de aanvrager zien dat het virus geen ziekteverschijnselen veroorzaakt. Hieruit concludeert de aanvrager dat het virus met vier genoomsegmenten geattenuëerd is. Infectie-experimenten in lammeren met het ggo, waarin zowel het M-genoomsegment over twee segmenten verdeeld is als het NSs afwezig is, laten zien dat het virus geen ziekteverschijnselen veroorzaakt. Daarnaast is er geen viraal RNA aantoonbaar in de bloedmonsters van deze lammeren. De aanvrager concludeert uit deze experimenten dat het ggo geattenuëerd is.

Op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens in combinatie met de in de wetenschappelijke literatuur gepubliceerde gegevens over de RVFV NSs deletiemutanten, is de COGEM van mening dat de beide gg-RVFV varianten in de aangevraagde proefdiermodellen minder pathogeen zijn dan *wildtype* RVFV.

De waargenomen attenuatie van betreffende gg-RVFV varianten in dieren suggereert dat ook de kans op ziekte in de mens na infectie met deze gg-RVFV's zal zijn afgenomen. Voor zover bij de COGEM bekend zijn er geen wetenschappelijke gegevens beschikbaar waaruit dit direct afgeleid kan worden. De COGEM wijst er op dat de attenuatie is waargenomen in drie verschillende diermodellen. Hierbij wordt deze attenuatie reeds gerealiseerd door één van de twee wijzigingen die in de gg-RVFV varianten zitten. Daarbij is in Zuid-Afrika sinds 2010 een veterinair vaccin op de markt toegelaten dat op de RVFV vaccinstam Clone 13 is gebaseerd.¹⁵ Er zijn sindsdien miljoenen doses van dit vaccin gebruikt zonder melding van mogelijke schadelijke neveneffecten voor mens of dier.

Hoewel de COGEM theoretisch niet kan uitsluiten dat de mate van attenuatie in mensen mogelijk minder sterk zal zijn, ziet zij op basis van de beschikbare gegevens geen reden om aan te nemen dat de waargenomen attenuatie in dieren niet representatief is voor de humane situatie.

Verspreiding van gg-RVFV

Onder dieren wordt RVFV voornamelijk verspreid door verschillende muggensoorten.^{1,3} In dierexperimenteel onderzoek is ook horizontale overdracht van RVFV tussen schapen zonder tussenkomst van vectoren waargenomen.⁴ Mensen worden voornamelijk geïnfecteerd na direct of indirect contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren. Ook inhalatie van aerosolen en muggenbeten kunnen bij de mens tot infectie met RVFV leiden. Voor zover bij de COGEM bekend is, is tot op heden nog nooit melding gemaakt van een RVFV transmissie van mens op mens.¹⁶

Om te onderzoeken of RVFV zich via aerosolen onder muizen kan verspreiden, heeft de aanvrager zowel BALB/c muizen als IFNAR-/- muizen geïnoculeerd met volvirulent RVFV en gehuisvest naast controle muizen. Deze controle groepen waren fysiek gescheiden van de geïnoculeerde groepen en stonden alleen via de lucht in contact met elkaar. In geen van de controle dieren werden klinische symptomen waargenomen die met een RVFV infectie geassocieerd konden worden. De mogelijkheid van horizontale transmissie heeft de aanvrager ook onderzocht in een groep van lammeren die met dexamethason waren behandeld om ze vatbaarder te maken voor virusinfecties. Deze lammeren werden gehuisvest bij een viertal RVFV geïnoculeerde lammeren. Net als bij het experiment met de muizen werden bij de contactlammeren geen symptomen waargenomen die duiden op een infectie met RVFV. De aanvrager geeft verder aan dat in muizen en schapen geen viremie gedetecteerd wordt na inoculatie van deze dieren met een hoge dosis van een gg-RVFV waarvan alleen het M genoomsegment over twee segmenten was verdeeld.

Op basis van deze bevindingen acht de COGEM de kans zeer klein dat in voorgenomen studies met betreffende gg-RVFV mutanten het gg-RVFV via aerosolen overgedragen kan worden tussen muizen of schapen. Bovendien acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de muggen die RVFV

kunnen overdragen in een ML-II of DM-II laboratorium aanwezig zijn, geïnfecteerd raken met het gg-RVFFV en het ggo door een bloedmaal op mens of dier overdragen.

De COGEM wijst er op dat de medewerker tijdens de werkzaamheden onbedoeld door met name een prikincident besmet kan raken met het ggo. Op basis van de waargenomen attenuatie van dit ggo in dieren acht de COGEM de kans zeer klein dat de medewerker ziek wordt van een dergelijk incident. Door het ontbreken van direct bewijs over de mogelijke apathogeniteit van het ggo in de mens en de mogelijk hoge concentraties die in deze experimenten worden gebruikt, kan de COGEM dit echter niet volledig uitsluiten.

Met het oog op een mogelijke uitsleep en verspreiding in het milieu wijst de COGEM erop dat de overdracht van mens op mens nooit is beschreven. Bovendien heeft de aanvrager aangetoond dat in de meest gevoelige dieren (muis) en de natuurlijke gastheer (schaap) het gg-RVFFV niet leidt tot viremie. De deletie van het gen coderend voor NSs en het splitsen van het M-genoomsegment in twee aparte segmenten lijkt *in vivo* derhalve een aanzienlijke biologische inperking te genereren die de kans op verspreiding van het ggo minimaliseert.

Advies

In vitro werkzaamheden met gg-RVFFV

Gezien bovenstaande overweging adviseert de COGEM om de *in vitro* werkzaamheden met de beschreven gg-RVFFV virusdeeltjes uit te voeren op ML-II inperkingsniveau en de daarbij geldende standaard voorschriften te hanteren. Gezien de relatief hoge virusconcentraties die bij de productie van het ggo kunnen worden bereikt en het feit dat RVFFV ook via wondjes of prikaccidenten overgedragen zou kunnen worden, adviseert de COGEM hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Tijdens de werkzaamheden dienen handschoenen te worden gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen.

In vivo werkzaamheden met gg-RVFFV

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-RVFFV in associatie met muizen, schapen of runderen uit te voeren op DM-II inperkingsniveau en hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren.

- De werkzaamheden met proefdieren worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd of tijdens deze werkzaamheden wordt een mond- en neuskapje van P2 of hogere specificatie en een veiligheidsbril gedragen of tijdens deze werkzaamheden wordt een volgelaatsmasker gedragen;
- Tijdens de werkzaamheden dienen handschoenen te worden gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen.

Challenge experimenten met vol-virulent RVFV

Experimenten in proefdieren waarbij gebruik gemaakt wordt van het vol-virulente wild-type RVFV dienen conform de inschaling van RVFV in pathogeniteitsklasse 3 op DM-III inperkingsniveau uitgevoerd te worden. Naast de op dit niveau geldende voorschriften moet hierbij ook het volgende aanvullende voorschrift gehanteerd worden:

- Tijdens de werkzaamheden wordt een mond- en neuskapje van P2 of hogere specificatie en een veiligheidsbril, of een volgelaatsmasker gedragen.

Op de genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. The World Organisation for Animal Health (OIE). Disease Information Summaries. Rift Valley fever. www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/RVF-EN.pdf (bezoekt: 4 mei 2015)
2. World Health Organization (WHO). Rift Valley fever virus: Factsheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/ (bezoekt: 4 mei 2015)
3. Health Protection Agency (HPA). Rift Valley fever: Topic www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/RiftValleyFever/ (bezoekt: 4 mei 2015)
4. Busquets N *et al.* (2010). Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 689-696
5. Plyusnin A *et al.* (2012). Family Bunyaviridae. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
6. Billecocq A *et al.* (2004). NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J Virol* 78: 9798-9806
7. Ikegami T *et al.* (2006). Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J Virol* 80: 2933-2940
8. Muller R *et al.* (1995). Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg* 53: 405-411
9. Bouloy M *et al.* (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol* 75: 1371-1377
10. von Teichman B *et al.* (2011). Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves. *Vaccine* 29: 5771-5777
11. Dingu B *et al.* (2010). Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine* 28: 4581-4587
12. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met het genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVFV). COGEM advies CGM/080313-05
13. COGEM (2011). Inschaling werkzaamheden genetische gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVFV). COGEM advies CGM/110322-01
14. COGEM (2012). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*. COGEM advies CGM/120716-02
15. Wichgers Schreur PJ *et al.* (2015). Four-segmented Rift Valley fever virus induces sterile immunity in sheep after a single vaccination. *Vaccine* 33: 1459-1464
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013). Rift Valley Fever (RVF). Transmission. www.cdc.gov/vhf/rvf/transmission/index.html (bezoekt: 13 mei 2015)