

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 10 maart 2016  
**KENMERK** CGM/160310-01  
**ONDERWERP** Advies: Omlaagschaling werkzaamheden met gg-*Vesicular stomatitis Indiana virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Vesicular stomatitis Indiana* virussen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) dat het manteleiwit van het *Zaire Ebolavirus* (ZEBOV) bevat (VSIV-ZEBOV). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II niveau te mogen uitvoeren.

Het wild-type VSIV veroorzaakt een ziekte in vee met symptomen die lijken op monden-klauwzeer. De COGEM heeft het VSIV als een klasse 3 dierpathogeen geclassificeerd. Conform de Regeling ggo zouden de werkzaamheden met het gg-virus minimaal op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd moeten worden.

Vanwege de recente ebola-crisis zijn er inmiddels duizenden mensen gevaccineerd met zowel een hoge als lage dosis van het gg-VSIV-ZEBOV zonder dat er sprake is van sterfte of ernstige bijwerkingen. Op basis van de resultaten uit verschillende vaccinatiestudies acht de COGEM het aannemelijk dat het gg-VSIV-ZEBOV vaccin voldoende geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.

De COGEM kan niet uitsluiten dat een eventuele besmette medewerker het gg-virus in het milieu zal uitscheiden. Om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met gg-VSIV-ZEBOV en om eventuele verspreiding van het gg-virus naar landbouwhuisdieren te minimaliseren, adviseert de COGEM enkele aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende werkvoorschriften 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  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus*

## COGEM advies CGM/160310-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met replicatiecompetent, genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV) gepseudotypeerd met het glycoproteïne van het *Zaire ebolavirus* (ZEBOV). Het gg-virus is afkomstig van Merck & Co., Inc. uit de Verenigde Staten. De aanvrager wil de concentratie bepalen en het opzuiveringsproces van de gg-VSIV-ZEBOV virusdeeltjes optimaliseren. De aanvrager verzoekt de experimenten op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

### *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV)

Voorheen werd VSIV aangeduid als *Vesicular stomatitis virus* (VSV). Volgens de 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV) is *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) echter de officiële naam. Deze naam zal ook in het onderhavige advies gehanteerd worden.<sup>1,2</sup>

Het VSIV behoort tot het genus *Vesiculovirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*. Het genus *Vesiculovirus* omvat 9 verschillende virussoorten.<sup>2</sup> Vesiculovirussen infecteren vooral zoogdieren en vissen. In endemische gebieden infecteren zij ook vogels en reptielen. De virussen worden overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren of via inhalatie van virus bevattende aërosolen.<sup>3</sup>

VSIV is enzoötisch in Mexico, Centraal Amerika, het noordelijk deel van Zuid-Amerika en Oost-Brazilië. Het virus veroorzaakt de ziekte 'vesicular stomatitis' in vee, waaronder koeien, paarden en varkens.<sup>4</sup> Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren en lijkt daarmee sterk op mond- en klauwzeer.<sup>5</sup> Hoewel de mortaliteit in dieren zeer laag is, bestaat er nog geen specifieke behandeling tegen de ziekte.<sup>5</sup> De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSIV herstellen binnen twee weken.<sup>5</sup> Een uitbraak van VSIV kan grote economische schade tot gevolg hebben.

VSIV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren. Ook is infectie door blootstelling aan het virus in het laboratorium beschreven.<sup>3,4</sup> De meeste humane infecties verlopen zonder klinische verschijnselen. Mensen die wel ziek worden, ontwikkelen in eerste instantie hoge koorts gevolgd door griepachtige symptomen, waaronder hoofdpijn, misselijkheid, spierpijn en gewrichtspijn. De ziekte duurt doorgaans drie tot zes dagen en wordt niet geassocieerd met sterfte.<sup>4</sup> Verspreiding tussen mensen onderling is tot op heden niet in de literatuur gerapporteerd.<sup>6</sup> Er is nog geen specifieke behandeling van patiënten voorhanden. De behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding.

### *Het VSIV genoom*

Het VSIV heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het zogenaamde nucleoproteïne (N-eiwit), het phosphoproteïne (P-eiwit), het matrixproteïne (M-eiwit), het glycoproteïne (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).<sup>3</sup> Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje. De N, L en P eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie.<sup>4</sup> Het G-eiwit bevindt zich in het lipidenmembraan en is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheercel.<sup>3</sup> Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, virus ‘budding’ en de apoptose van de cel.<sup>4</sup>

### ***Filoviridae***

Het Ebolavirus behoort tot de familie der *Filoviridae*. Dit negatief enkelstrengs RNA virus is endemisch in Centraal-Afrika en veroorzaakt een zeer ernstige vorm van hemorrhagische koorts in mensen en niet-menselijke primaten die in bijna negentig procent van de gevallen een dodelijke afloop kent.<sup>1</sup> De meest recente ebola-epidemie, die in december 2013 in West-Afrika begon, heeft al aan meer dan 11.000 mensen wereldwijd het leven gekost.<sup>7,8</sup> Inmiddels lijkt de epidemie ten einde.<sup>7</sup>

De ziekte presenteert zich over het algemeen acuut waarbij symptomen als algehele malaise, koorts, hoofdpijn en myalgie optreedt. Daarnaast worden regelmatig andere symptomen zoals keelpijn, misselijkheid, braken, buikpijn, diarree, pijn op de borst en hoesten waargenomen. Rond de vijfde ziektedag kunnen er puntvormige huidbloedingen, bloeduitstortingen onder de huid en mucosale bloedingen optreden. Sterfte treedt doorgaans op in de tweede week na besmetting.<sup>9</sup>

Vanwege de hoge virulentie, de afwezigheid van effectieve therapie en het feit dat transmissie via aërosolen kan plaatsvinden, is het Ebolavirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.<sup>10</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil de concentratie bepalen en het opzuiveringsproces van de recombinante VSIV deeltjes optimaliseren. In het gg-VSIV is het gen dat codeert voor de virale glycoproteïne (G) vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus. Het gg-virus wordt geproduceerd door Merck & Co., Inc. in de Verenigde Staten. De aanvrager verzoekt de experimenten op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2012 geadviseerd over de classificatie van VSIV en over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetente VSIV deeltjes, waarin het gen dat codeert voor de virale glycoproteïne is vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus.<sup>11</sup> De COGEM was destijds van mening dat de aangeleverde literatuurgegevens niet overtuigend bewezen dat de recombinante VSIVs voldoende geattenuëerd waren ten opzichte van het wild-type VSIV om omlaagschaling van pathogeniteitsklasse 3 naar 2 te

rechtvaardigen. De COGEM vond daarom dat de werkzaamheden met de replicatiecompetente gg-VSIV deeltjes, conform de classificatie van het VSIV, op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd moesten worden.<sup>11</sup>

## **Overweging**

### *Classificatie*

VSIV veroorzaakt ‘vesicular stomatitis’ in vee. Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren en lijkt daarmee sterk op mond-enklauwzeer. Een infectie met VSIV kan ertoe leiden dat er op grote schaal geruimd moet worden. Omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen, niet enzoötisch aanwezig is en er geen profylaxe of therapie beschikbaar is, kunnen de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk zijn. Er zijn geen nieuwe gegevens over de pathogeniteit of de verspreiding van het virus bekend. Op basis van de huidige wetenschappelijke kennis ziet de COGEM geen reden om haar eerdere classificatie van VSIV als klasse 3 dierpathogeen te herzien.

### *Pathogeniteit van gg-VSIV-ZEBOV*

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met replicatiecompetent VSIV (een klasse 3 virus) dat gepseudotypeerd is met het glycoproteïne van het Ebolavirus (een klasse 4 virus). Conform de Regeling ggo zou een dergelijk chimeer virus minimaal op ML-III inperkingsniveau ingeschaald moeten worden. De aanvrager is van mening dat het gebruikte gg-VSIV-ZEBOV vaccin voldoende geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV en veilig is voor mensen en relevante diersoorten, zoals varkens, om een inschaling op ML-II niveau te rechtvaardigen. Ter onderbouwing hiervoor verwijst de aanvrager naar verschillende vaccinatiestudies in mensen met het gg-VSIV-ZEBOV vaccin. Tevens verwijst de aanvrager naar een studie in niet-humane primaten en een studie in varkens. Deze studies worden hieronder behandeld.

Tijdens de meest recente ebola-epidemie is in Guinee een ring-vaccinatie studie uitgevoerd met het gg-VSIV-ZEBOV vaccin.<sup>12</sup> Het vaccin is daarbij getest in verschillende groepen; 48 *immediate vaccination clusters* en 42 *delayed vaccination cluster*. In de *immediate vaccination clusters* zijn in totaal 2014 mensen gevaccineerd met een dosis van  $2 \times 10^7$  *plaque-forming units* (pfu). In de *delayed vaccination clusters* zijn 21 dagen later in totaal 1498 deelnemers met dezelfde dosis gevaccineerd. Bij geen van de gevaccineerde mensen werd Ebola vastgesteld. Bij de niet-gevaccineerde deelnemers die in de studie waren opgenomen, werd bij 75 deelnemers Ebola vastgesteld waarvan er 33 zijn overleden.<sup>12</sup>

Het gg-VSIV-ZEBOV vaccin is tevens getest in 158 gezonde proefpersonen in Europa en Afrika verspreid over vier klinische studies.<sup>13</sup> Uit een fase I/II klinische studie uitgevoerd in Genève bleek de gg-VSIV-ZEBOV stam bij 11 van in totaal 51 gevaccineerde proefpersonen viremie met symptomen als dermatitis, artritis en vasculitis te veroorzaken.<sup>14</sup> Deze symptomen traden op bij hoge doseringen van  $1 \times 10^7$  pfu (8 proefpersonen) of  $5 \times 10^7$  pfu (3 proefpersonen) en waren in de meeste gevallen mild en van voorbijgaande aard.<sup>14</sup> Vanwege deze bijwerkingen kreeg een tweede

groep proefpersonen een lagere dosis van  $3 \times 10^5$  pfu toegediend. Dit reduceerde het optreden van viremie, maar kon de verspreiding van het virus naar gewrichten, huid en endotheelcellen niet voorkomen.<sup>14</sup> Ook had de dosisreductie een negatieve impact op de ontwikkeling van antistoffen. Bij geen van de vier beschreven studies werd viraal RNA aangetroffen in speeksel of urine samples.<sup>13</sup>

Verder is in 2012 de neurovirulentie van het gg-VSIV-ZEBOV vaccin getest in zeven niet-humane primaten.<sup>15</sup> De primaten kregen een dosis van  $1 \times 10^7$  pfu ingespoten in de thalamus. Als controle werden drie apen geïnoculeerd met recombinant wild-type VSIV (rVSIV, geproduceerd via *reverse genetics*<sup>16</sup>) en twee apen met een negatieve controle. Twee van de drie apen geïnoculeerd met rVSIV ontwikkelden klinische symptomen van neurovirulentie. Bij deze apen werden de grootste concentraties rVSIV en rVSIV RNA in het zenuwweefsel aangetroffen. Bij de met gg-VSIV-ZEBOV geïnoculeerde apen bleek neurovirulentie afwezig en was viraal RNA niet te detecteren in onder andere zenuwweefsel, milt, lever, hart en nieren. In drie dieren geïnoculeerd met gg-VSIV-ZEBOV werd viraal RNA aangetroffen in nasale, orale en rectale swabs, maar bij slechts in 1 dier werd (een lage concentratie) virus aangetroffen.<sup>15</sup> Op basis van de bevindingen uit de swabs suggereren de auteurs dat het gg-VSIV-ZEBOV zich mogelijk via de zenuwcellen door de olfactorische knobbel (reukkwab) naar de olfactorische zenuwen verplaatst hebben.

Naast de situatie in mensen en niet-humane primaten is de attenuatie van de gg-VSIV-ZEBOV stam onderzocht in varkens (een gevoelige diersoort). In een studie van de Wit *et al.* zijn twee groepen varkens (n=5 en n=6) intradermaal (direct in de snuit) geïnoculeerd met een dosis van  $10^6$  pfu recombinant wild-type VSIV of de gg-VSIV-ZEBOV stam.<sup>17</sup> Volgens de auteurs van het artikel leidde inoculatie met gg-VSIV-ZEBOV niet tot klinische verschijnselen en was de shedding van het gg-virus minimaal. Shedding van het gg-virus werd in 1 neusswab vastgesteld met lage titer ( $10^{2.6}$  TCID<sub>50</sub>/g). De auteurs concluderen op basis van het onderzoek dat de gg-VSIV-ZEBOV stam veilig is voor varkens. Zij stellen verder dat indien varkens per ongeluk geïnfecteerd raken via met gg-VSIV-ZEBOV gevaccineerde mensen het zeer onwaarschijnlijk is dat ziekteverschijnselen ontstaan of dat het virus zich verder onder varkens verspreidt.<sup>17</sup>

Naar aanleiding van deze studie wijst de COGEM erop dat varkens die geïnoculeerd werden met recombinant wild-type VSIV geen ziekteverschijnselen vertoonden, waardoor niet met zekerheid te concluderen is dat gg-VSIV-ZEBOV apathogeen is voor varkens. De COGEM acht deze studie daarom niet van waarde voor de overwegingen in dit advies.

#### *Samengevat*

Er zijn tot op heden duizenden mensen gevaccineerd met zowel een hoge als lage dosis van het gg-virus zonder dat er sprake is van sterfte of ernstige bijwerkingen. De bijwerkingen die bij sommige proefpersonen werden gevonden, waren doorgaans mild en van voorbijgaande aard. Er werd geen viraal RNA in speeksel of urine monsters aangetroffen.

Ook bij niet-humane primaten werden er geen schadelijke gevolgen geconstateerd na inoculatie met een hoge concentratie van het gg-vaccin. Dit in tegenstelling tot apen die werden geïnoculeerd met wild-type rVSIV. Bij enkele gevaccineerde dieren werd viraal RNA aangetroffen in nasale, orale en rectale swabs, maar bij slechts in 1 dier werd een lage concentratie van het gg-virus aangetroffen.

Op basis van deze gegevens acht de COGEM het aannemelijk dat het gg-VSIV-ZEBOV geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV. De COGEM kan echter niet uitsluiten dat een medewerker na besmetting infectieus virus in het milieu zal uitscheiden.

### **Advies**

Het gg-VSIV-ZEBOV vaccin is door de recente ebola-crisis veelvuldig getest in mensen. Ook is het gg-vaccin onderzocht in niet-humane primaten. In deze studies was geen sprake van sterfte of ernstige bijwerkingen. Ook werd er nauwelijks shedding van het virus geconstateerd. Op basis van deze studies acht de COGEM het aannemelijk dat het gg-VSIV-ZEBOV vaccin voldoende geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.

De COGEM kan niet uitsluiten dat een eventueel besmette medewerker infectieus virus in het milieu zal uitscheiden. Om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met het gg-VSIV-ZEBOV vaccin en om eventuele verspreiding naar landbouwhuisdieren te minimaliseren, adviseert de COGEM de volgende aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen:

- open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet,
- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen,
- laboratoriummedewerkers mogen geen contact hebben met varkens, grote en kleine herkauwers en paarden tot 3 dagen na het werken met gg-VSIV-ZEBOV

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### **Referenties**

1. 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
2. Virus Taxonomy: 2014 Release. Zoekterm: Vesicular stomatitis Indiana virus <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (bezocht 1 maart 2016)
3. Rose JK & Whitt MA (2001). *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In Fields Virology. Ed. Knipe MD and Howley PM. Philadelphia:

4. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends. Mol. Med.* 10: 210-216.
5. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157: 239-60
6. Public Health Agency of Canada (PHAC).  
www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/stomatit-eng.php (1 maart 2016)
7. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu. Ebola-uitbraak West-Afrika 2014/2015  
[www.rivm.nl/Onderwerpen/E/Ebola/Ebola\\_uitbraak\\_West\\_Afrika\\_2014\\_2015](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/E/Ebola/Ebola_uitbraak_West_Afrika_2014_2015) (bezocht 1 maart 2016)
8. World Health Organization. Situation Report. [www.who.int/csr/disease/ebola/en/](http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/) (bezocht 1 maart 2016)
9. LCI-richtlijn Virale hemorrhagische koorts: Filovirussen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. <http://bit.ly/HWPDjX> (bezocht 1 maart 2016)
10. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
11. COGEM (2012). Inschaling van onderzoek naar Ebolavirus en Marburgvirus infecties met genetisch gemodificeerd VSIV. COGEM advies CGM/120417-02
12. Henao-Restrepo *et al.* (2015). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet* 386: 857-866
13. Agnandji ST *et al.* (2015). Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe – Preliminary report. *N. Engl. J. Med.* Epub ahead of print
14. Huttner A *et al.* (2015). The effect of dose on the safety and immunogenicity of the VSV Ebola candidate vaccine: a randomised double-blind, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 15: 1156-1166
15. Mire CE *et al.* (2012). Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 6: e1567
16. Lawson ND *et al.* (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4477-4481
17. de Wit E *et al.* (2015). Safety of recombinant VSV-Ebola virus vaccine vector in pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 702-704