

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 30 oktober 2017
KENMERK CGM/171030-03
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 16-389_2.8-001 getiteld "In vitro productie van VEEV en SPDV replicon deeltjes met aquatische donorsequenties" van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zogenoemde replicons die gebaseerd zijn op *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en *Salmon pancreas disease virus* (SPDV). De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)VEEV en gg-SPDV replicons op ML-I uit te voeren.

De aanvrager heeft de structurele genen uit het RNA genoom van VEEV en SPDV verwijderd. Hierdoor ontstaan gg-replicons die in een cel kunnen repliceren, maar niet kunnen verspreiden tot buiten de cel. Om de gg-replicons in te brengen in cellen, produceert de aanvrager eerst gg-replicondeeltjes waarbij de structurele eiwitten om een virusdeeltje te vormen, worden aangeboden vanaf genen gelegen op separate helper RNA's. De geproduceerde gg-replicondeeltjes kunnen hierdoor cellen infecteren, waarna het replicon RNA zich in de cellen kan repliceren.

Tijdens de productie van de gg-replicondeeltjes zou door homologe recombinitie, replicatiecompetent virus (RCV) kunnen ontstaan. Door een aantal aanpassingen die zijn aangebracht in het productiesysteem van de gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat RCV gevormd wordt. De COGEM is daarom van oordeel dat het uitvoeren van een RCV-test tijdens de productie van de gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes vanuit milieurisico-overwegingen niet noodzakelijk is.

De aanvrager heeft op het replicon RNA de sequentie van genen/genoomsegmenten van verschillende visvirussen, waaronder SPDV, toegevoegd. Hoewel de genen/genoomsegmenten coderen voor structurele eiwitten van deze virussen, acht de COGEM de kans op vorming van infectieuze *virus-like vesicles* (VLVs), die zich van cel tot cel kunnen verspreiden, verwaarloosbaar klein.

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn en zij kan daarom instemmen met inschaling van de werkzaamheden op ML-I.



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 IenW

Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties

COGEM advies CGM/171030-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een wijziging op vergunning IG 16-389 van Intervet International B.V., getiteld: 'In vitro productie van VEEV en SPDV replicon deeltjes met aquatische donorsequenties'. De aanvrager is voornemens om *in vitro* werkzaamheden uit te voeren met alphavirusreplicons, afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en *Salmon pancreas disease virus* (SPDV). De geproduceerde replicondeeltjes bevatten genen/genoomsegmenten die coderen voor structurele eiwitten van SPDV of van verscheidende andere visvirussen. De aanvrager wil de productie van, en de infectie met gg-replicondeeltjes, uitvoeren in dierlijke cellen. De aanvrager verzoekt om deze werkzaamheden op ML-I uit te voeren. De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van de voorgenomen werkzaamheden.

2. Alphavirus

De productiesystemen van de gg-replicondeeltjes in de onderhavige vergunningaanvraag zijn gebaseerd op de VEEV vaccinstam TC-83 en op SPDV. VEEV en SPDV zijn RNA virussen die behoren tot de familie *Togaviridae* en het genus *Alphavirus*.^{1,2} Alphavirussen hebben een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten,³ en worden overgedragen door insecten (voornamelijk muggen). Via deze route kunnen ook mensen geïnfecteerd raken.

Alphavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA genoom van 9,7 tot 11,8 kb. De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.⁴ Daarnaast bezitten alphavirussen drie structurele eiwitten: C, E1 en E2. Het capsid eiwit (C) vormt een eiwitmantel die het RNA omgeeft, het nucleocapsid. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan waarin zich de glycoproteïnen (E1 en E2) bevinden die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel. De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.

2.1 *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) vaccinstam TC-83

Er is op dit moment één levend verzwakt VEEV vaccin beschikbaar, genaamd TC-83. Deze vaccinstam is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. Als gevolg is het virus op verscheidene plaatsen gemuteerd in het virale genoom, wat gezorgd heeft voor attenuatie van deze VEEV stam.^{5,6} TC-83 is jarenlang gebruikt voor de vaccinatie van mensen en paarden. Er is in die periode geen melding gemaakt van ernstige ziekte, of dat reversie van het virus was opgetreden. De COGEM is van oordeel dat VEEV vaccinstam TC-83 minder pathogeen is voor mens en dier dan wildtype VEEV en heeft deze vaccinstam recent geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.⁷

2.2 Salmon pancreas disease virus (SPDV)

SPDV is geïsoleerd uit de zalmsoort *Salmo salar* L. in 1995 en is daarmee het eerst beschreven alphavirus in vissen.⁸ Samen met de virussen *Sleeping disease virus* en *Norwegian salmonid alphavirus* vormt SPDV een genetisch losstaande groep binnen de alphavirussen. SPDV wordt ook wel *Salmonid alphavirus 1* genoemd. Aquatische alphavirussen zijn aangetroffen bij gekweekte zalm en forel in West-Europa en Noord-Amerika. SPDV veroorzaakt alvleesklierziekte bij gekweekte regenboogforel en Atlantische zalm. Zieke vissen eten minder, zijn futloos en vertonen een toename in uitwerpselen. Er zijn verschillende vaccins tegen alvleesklierziekte beschikbaar.⁹

Voor SPDV is geen vector bekend, in tegenstelling tot de overige alphavirussen. Transmissie kan direct tussen vissen plaatsvinden.¹⁰ Onder laboratoriumcondities kan het virus minstens twee maanden in zeewater bij lage temperaturen overleven.¹¹

Er zijn geen gevallen bekend van infecties van SPDV bij mensen of andere gewervelden dan vissen. De COGEM heeft SPDV ingedeeld als strikt dierpathogeen van pathogeniteitsklasse 2.¹²

3. Aquatische donorsequenties

De aanvrager is van plan om structurele eiwitten van verscheidene visvirussen tot expressie te brengen vanaf de gg-VEEV en gg-SPDV replicons. Daartoe wil de aanvrager donorsequenties met genen/genoomsegmenten die coderen voor deze eiwitten op het replicon RNA aanbrengen. Het betreft 'aquatische' donorsequenties van de onderstaande, strikt dierpathogene virussen van pathogeniteitsklasse 2.¹³

3.1 Infectious salmon anemia virus (ISAV)

Infectious salmon anemia virus (ISAV) behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en het genus *Isavirus*. Het virusgenoom bestaat uit een negatief enkelstrengs RNA genoom bestaande uit 8 segmenten. Elk segment codeert voor één 'open reading frame' (ORF), met uitzondering van 2 segmenten die elk coderen voor twee ORFs.¹⁴ Er zijn vier structurele eiwitten geïdentificeerd, namelijk het nucleoproteïne (NP), het matrix proteïne (M), en de twee glycoproteïnen hemagglutinin-esterase (HE) en fusie-eiwit (F). Zowel HE als het F-eiwit zijn betrokken bij de binding aan de receptor van de gastheercel en de fusie met de gastheercel.

3.2 Tilapia lake virus (TiLV)

Het Tilapia lake virus (TiLV) is ontdekt in 2014, waarbij het uit tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus* hybride) geïsoleerd is.¹⁵ TiLV zal mogelijk in een nieuw genus van de familie *Orthomyxoviridae* ondergebracht worden.¹⁶ Het virusgenoom bestaat uit een negatief enkelstrengs RNA genoom van 10 segmenten waarop een ORF is gelegen. Het ORF van het grootste segment vertoont een zwakke sequentiehomologie met de polymerase subunit (PB1) gen van het *Influenza C virus* (een orthomyxovirus).

3.3 Red sea bream iridovirus (RSIV)

Red sea bream iridovirus (RSIV) behoort tot de familie van de *Iridoviridae* en het genus *Megalocytivirus*. Op dit moment is RSIV nog niet definitief taxonomisch ingedeeld. Het virusgenoom

bestaat uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul en bevat ongeveer 30 genen die voorkomen in alle iridovirussen, en 86 genen die specifiek zijn voor RSIV.¹⁷

3.4 Scale drop disease virus (SDDV)

Scale drop disease virus (SDDV) is recent geïdentificeerd als veroorzaker van ‘scale drop syndrome’ (SDS) en is op basis van genetische en morfologische eigenschappen ingedeeld in de familie van de *Iridoviridae*.¹⁸ SDDV is nog niet definitief taxonomisch ingedeeld. Het SDDV genoom bestaat uit een dubbelstrengs DNA genoom met een lengte van 125 kb, waarop zich minstens 129 ORFs bevinden.

3.5 Piscine orthoreovirus (PRV)

Piscine orthoreovirus (PRV) behoort tot de familie van de *Reoviridae* en tot het genus *Orthoreovirus*. PRV heeft een dubbelstrengs RNA genoom bestaande uit 10 segmenten, die onderverdeeld zijn in 3 lange (L1-3), 3 middelgrote (M1-3) en 4 kleine (S1-4) segmenten. Op deze segmenten bevinden zich een totaal van 13 ORFs.¹⁹

3.6 Betanodavirussen

Het genus *Betanodavirus* behoort tot de familie van de *Nodaviridae*. Deze virussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van twee segmenten. Het RNA1 segment codeert voor het RNA replicase, en het RNA2 segment codeert voor het manteleiwit.²⁰ Betanodavirussen zijn onderverdeeld in vier verschillende soorten: *Barfin flounder nervous necrosis virus* (BFNNV), *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV), *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV), en *Tiger puffer nervous necrosis virus* (TPNNV).²¹ Later is er een vijfde soort voorgesteld, het zogenaamde Turbot betanodavirus (TNV).²² TNV is nog niet definitief taxonomisch ingedeeld.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met SPDV. Wel heeft de COGEM meerdere keren geadviseerd over werkzaamheden met hetzelfde VEEV repliconsysteem uit de onderhavige vergunningaanvraag.^{23,24,25,26}

De COGEM heeft in eerste instantie in een advies uit 2016 de werkzaamheden met gg-VEEV PEDV/GFP replicons ingeschaald op ML-II en DM-II niveau. Zij kwam hiertoe, omdat op basis van de overlegde informatie niet volledig uitgesloten kon worden dat tijdens het productieproces replicatiecompetent virus (RCV), als gevolg van recombinatie tussen het gg-VEEV replicon RNA en de helper RNA's, kon ontstaan.^{23,24} Met een gevalideerde RCV-test heeft de vergunningaanvrager vervolgens in 2060 productiebatches aangetoond dat er geen RCV aanwezig was. Aan de hand van deze informatie kwam de COGEM tot het oordeel dat de kans op het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein is en dat de werkzaamheden met het VEEV repliconsysteem op ML-I en DM-I konden plaatsvinden. Tevens adviseerde de COGEM dat deze inschalingsniveaus gehanteerd kunnen worden bij werkzaamheden met dit repliconsysteem in combinatie met andere (virale) inserts, proefdiersoorten, en/of toedieningsroutes. Zij stelde hierbij de voorwaarde dat er geen schadelijke genen ingebracht worden (in lijn met de Regeling ggo), of genen die mogelijk kunnen leiden tot het ontstaan van RCV. Daarnaast geldt de omlaagschaling alleen onder het voorbehoud dat de replicon-

inserts het inperkende effect van de aangebrachte deleties in gg-VEEV niet ongedaan maken, zoals het geval zou kunnen zijn bij sequenties van virusspecies uit de *Togaviridae* of de *Rhabdoviridae*. De COGEM heeft erop gewezen dat expressie van het G-eiwit van het *Indiana vesiculovirus* (voorheen vesicular stomatitis Indiana virus, VSIV), behorende tot de familie *Rhabdoviridae*, in vergelijkbare *Alphavirus* repliconsystemen leidt tot de vorming van infectieuze *virus-like vesicles* (VLVs) die zich van cel tot cel kunnen verspreiden.^{26,27,28}

5. Werkzaamheden

De aanvrager is van plan verschillende gg-replicondeeltjes, afgeleid van SPDV en de levend verzwakte VEEV TC-83 vaccinstam, te produceren. De geproduceerde gg-replicondeeltjes zullen vervolgens gebruikt worden om dierlijke cellen te infecteren.

5.1 Productiesysteem van de gg-replicons

Voor de productie van de gg-replicondeeltjes maakt de aanvrager gebruik van een zogenaamd split-helper systeem, waarbij replicon RNA samen met twee verschillende helper RNA's in dierlijke cellen wordt getransfecteerd. In deze cellen zijn volgens de aanvrager geen wild-type VEEV of SPDV en andere verwanten virussen aanwezig. Het replicon RNA bevat de sequentie coderend voor de niet-structurele eiwitten en een donorsequentie van interesse. Het ene helper RNA bevat het gen dat codeert voor het capsid-eiwit, terwijl het andere helper RNA genen bevat die coderen voor de glycoproteïnen. Aangezien er sequentiehomologie bestaat in de 5' en 3'UTRs tussen het replicon RNA en de helper RNA's, is homologe recombinatie tijdens de productie van de gg-replicondeeltjes niet uitgesloten. Om de vorming van replicatiecompetent virus (RCV) als gevolg van recombinatie te voorkomen, heeft de aanvrager een aantal aanpassingen in de VEEV en SPDV repliconsystemen aangebracht. De aanvrager heeft 1) het 'packaging' signaal verwijderd uit de helper RNA's, 2) de 26S promotor elementen verwijderd uit de helper RNA's en 3) de 'self-cleavage' eigenschap van het capsid-eiwit verwijderd. Daarnaast heeft de aanvrager 4) mutaties aangebracht in de 5'en 3' UTRs van de helper RNA's. Deze mutaties resulteren in de introductie van stopcodons, in het geval 'in frame' recombinaties zouden plaatsvinden 'upstream' van de geïntroduceerde mutaties.

5.2 gg-replicons en donorsequenties

De aanvrager is van plan om gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes te produceren waarbij bepaalde donorsequenties/inserts op het replicon RNA aanwezig zijn. Het betreft de volgende inserts:

1. reportergenen, niet-coderend voor een schadelijk genproduct
2. genen coderend voor de glycoproteïnen van SPDV
3. 'aquatische' donorsequenties (AQUA): genen coderend voor structurele eiwitten van de visvirussen ISAV, RSIV, SDDV, BFNNV, RGNNV, SJNNV, TPNNV en TNV, of maximaal 5 genoomsegmenten van de visvirussen PRV en TiLV

Op basis van de aanwezigheid van deze donorsequenties op het replicon RNA, kan een onderscheid gemaakt worden tussen vier typen gg-replicondeeltjes die de aanvrager voornemens is te produceren:

1. VEEV replicons met donorsequenties afkomstig van verscheidene visvirussen (gg-VEEV-AQUA)
2. VEEV replicons met donorsequenties afkomstig van SPDV (gg-VEEV-SPDV)
3. SPDV replicons met donorsequenties afkomstig van verscheidene visvirussen (gg-SPDV-AQUA)
4. SPDV replicons met donorsequenties afkomstig van SPDV (gg-SPDV-SPDV)

De aanvrager verzoekt om zowel de productie van deze gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes en de infectie van dierlijke cellen met de geproduceerde gg-replicondeeltjes, op ML-I uit te mogen voeren.

De COGEM heeft eerder geadviseerd dat werkzaamheden met hetzelfde gg-VEEV repliconsysteem op ML-I kunnen plaatsvinden, onafhankelijk van het type insert, maar onder het voorbehoud dat de replicon-inserts niet coderen voor een schadelijk gen, of het inperkende effect van de deleties in gg-VEEV niet ongedaan maken. Dit laatste zou het geval kunnen zijn bij sequenties van virusspecies uit de *Togaviridae* of de *Rhabdoviridae*. De 'aquatische' donorsequenties (AQUA) in de onderhavige adviesvraag omvatten geen sequenties van virusspecies uit de *Togaviridae* of de *Rhabdoviridae*. Derhalve is de COGEM alleen gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met gg-VEEV-SPDV, gg-SPDV-AQUA en gg-SPDV-SPDV.

6. Overweging

6.1 gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes

De aanvrager is voornemens verschillende gg-replicondeeltjes afgeleid van VEEV TC-83 en SPDV te produceren en gebruiken. Het replicon RNA bevat de niet-structurele eiwitten in combinatie met reporter genen, of virale genen of genoomsegmenten van verscheidene visvirussen. Voor de productie van de gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes is de aanwezigheid van de structurele genen een vereiste en wordt gebruik gemaakt van twee verschillende helper RNA's die de structurele eiwitten *in trans* complementeren. De geproduceerde gg-replicondeeltjes kunnen wel een cel infecteren en erin repliceren, maar zich volgens de aanvrager niet tot buiten de cel verspreiden.

De biologische inperking van beide repliconsystemen zou opgeheven worden, indien RCV gevormd wordt tijdens de productie van de gg-replicondeeltjes. Daarnaast zou de aanwezigheid van de donorsequentie op het replicon RNA, coderend voor structurele (heterologe) eiwitten van (andere) visvirussen, in theorie kunnen leiden tot de vorming van infectieuze VLVs, die zich van cel tot cel kunnen verspreiden. De kans op vorming van RCV en VLVs tijdens de productie van gg-VEEV-SPDV, gg-SPDV-AQUA en gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes zal hieronder nader worden belicht.

6.2 Kans op het ontstaan van RCV

De aanvrager geeft aan dat het productiesysteem voor de gg-SPDV replicondeeltjes hetzelfde is als voor gg-VEEV-replicondeeltjes. De COGEM heeft al meerdere keren geadviseerd over werkzaamheden met het VEEV repliconsysteem uit de onderhavige vergunningaanvraag.^{23,24,25,26} Om de gg-replicondeeltjes te produceren worden cellen met het replicon RNA en twee helper RNA's getransfecteerd. Aangezien er sequentiehomologie bestaat in de 5' en 3' UTRs van de drie RNA's, acht de aanvrager het niet uitgesloten dat tijdens het productieproces RCV gevormd kan worden. In het

geval van de productie van de gg-VEEV-SPDV en gg-SPDV-AQUA replicondeeltjes, zijn twee onafhankelijke recombinaties noodzakelijk om een RCV te kunnen vormen. Tijdens de productie van de gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes zou daarentegen één recombinatie voldoende zijn om een RCV te vormen, aangezien de sequentie coderend voor de glycoproteïnen van SPDV op het replicon RNA aanwezig is.

Om de vorming van RCV te voorkomen, heeft de aanvrager daarom, zoals eerder benoemd, een aantal aanpassingen aangebracht in beide repliconsystemen. Daarnaast heeft de aanvrager eerder met een gevalideerde RCV-test aangetoond dat de kans op het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein is en dat er nooit RCV is aangetoond in 2060 productie batches gebaseerd op hetzelfde VEEV repliconsysteem als in onderhavige aanvraag.³⁹ Doordat de aanvrager gebruik maakt van het split-helpersysteem en daarbij een aantal aanpassingen heeft aangebracht, acht de COGEM de kans op vorming van RCV tijdens de productie van gg-VEEV-SPDV en gg-SPDV-AQUA replicondeeltjes verwaarloosbaar klein. Ook voor de productie van gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes is de COGEM van oordeel dat met de aanpassingen in het SPDV repliconsysteem de kans op RCV vorming verwaarloosbaar klein is. De COGEM gaat er vanuit dat bij alle werkzaamheden met het VEEV en SPDV repliconsystemen de gebruikte cellen vrij zijn van VEEV, SPDV en andere verwante virussen.

De aanvrager heeft aangegeven niet eerder een RCV-test te hebben uitgevoerd voor de productie van gg-VEEV-SPDV, gg-SPDV-AQUA en gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes. De COGEM is van mening dat vanuit de overweging van mogelijke risico's voor mens en milieu een RCV-test niet noodzakelijk is, maar zij geeft de aanvrager ter overweging om een RCV-test uit te voeren in het kader van 'quality control' en 'good practice', overeenkomstig met een eerder COGEM advies.

6.3 Kans op vorming van VLVs

Alphavirus-replicons waarin zich geen structurele genen bevinden, kunnen efficiënt repliceren binnen een gastheercel, maar kunnen zich niet naar andere cellen verspreiden omdat er geen virusdeeltjes gevormd worden. In de literatuur is echter beschreven dat de toevoeging van een donorsequentie die codeert voor het G-eiwit van het VSIV (genus *Vesiculovirus*) in een alphavirus-repliconsysteem, leidt tot de generatie van infectieuze VLVs.^{27,29} Deze VLVs kunnen zich in celculturen verspreiden, doordat zij de gastheercel kunnen verlaten en andere cellen kunnen infecteren. Omdat op het replicon RNA van de gg-SPDV-AQUA, gg-VEEV-SPDV en gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes, genen aanwezig zijn die coderen voor structurele eiwitten van verscheidene visvirussen of SPDV, zouden tijdens de werkzaamheden in theorie VLVs gevormd kunnen worden.

De COGEM is het eens met het oordeel van de aanvrager dat het split-helpersysteem en de aanpassingen die verricht zijn aan het SPDV repliconsysteem, vergelijkbaar zijn met het VEEV repliconsysteem. De COGEM is mede daarom van oordeel dat tijdens de productie van gg-SPDV-AQUA replicondeeltjes, analoog aan het VEEV repliconsysteem, de kans verwaarloosbaar klein is dat er VLVs gevormd worden, omdat de aquatische donorsequenties niet afkomstig zijn van virusspecies uit de *Togaviridae* of de *Rhabdoviridae*.

Ook voor de productie van gg-VEEV-SPDV replicondeeltjes acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat VLVs gevormd worden met de glycoproteïnen van SPDV. De glycoproteïnen van SPDV worden niet optimaal gevouwen bij temperaturen hoger dan 15°C. Hierdoor bereiken deze eiwitten niet de celmembraan, en kunnen er geen VLVs afsnoeren die het VEEV replicon RNA en de glycoproteïnen van SPDV bevatten. Bij temperaturen van 15°C of lager kan VEEV niet efficiënt repliceren, waardoor de vorming van VLVs eveneens voorkomen wordt.³⁰

In theorie zou het mogelijk zijn dat VLVs gevormd worden na infectie van dierlijke cellen met de geproduceerde gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes, omdat het replicon RNA naast de sequentie voor de niet-structurele eiwitten van SPDV, ook de sequentie voor de glycoproteïnen van SPDV bevat. De COGEM acht het ontstaan van VLVs in dit geval echter verwaarloosbaar klein. Zij komt tot dit oordeel, omdat voor de totstandkoming (assemblage) en ‘budding’ van alphavirussen een interactie noodzakelijk is tussen de capsid-eiwitten die het nucleocapsid vormen en het E2-glycoproteïne.^{31,32} Doordat de sequentie voor het capsid-eiwit van SPDV ontbreekt op het replicon RNA, is het daarom onwaarschijnlijk dat er virusdeeltjes/VLVs gevormd worden.

Indien in het onwaarschijnlijke geval dat VLVs toch gevormd zouden worden, dan acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van deze VLVs verwaarloosbaar klein. Voor zover bekend kan SPDV alleen bij (gekweekte) zalm en forel ziekte veroorzaken, en zijn SPDV en SPDV-VLVs niet in staat om mensen te infecteren. Hierdoor is het onwaarschijnlijk dat de VLVs zich buiten het laboratorium kunnen verspreiden. Derhalve acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat mogelijk gevormde VLVs zich kunnen verspreiden naar locaties waar zich kwetsbare soorten bevinden, zoals naar de weinige, kleine forelfokkerijen in Nederland.

7. Conclusie

De COGEM acht de kans op het ontstaan van RCV tijdens de productie van de gg-VEEV en gg-SPDV replicondeeltjes verwaarloosbaar klein, zolang bij alle werkzaamheden met deze repliconsystemen de gebruikte cellen vrij zijn van VEEV, SPDV en andere verwante virussen. Zij is daarom van oordeel dat het niet noodzakelijk is om RCV-testen uit te voeren vanuit het oogpunt van mogelijke risico's voor mens en milieu. Daarnaast acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat VLVs worden bij werkzaamheden met gg-VEEV-SPDV, gg-SPDV-AQUA en gg-SPDV-SPDV replicondeeltjes.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat alle voorgenomen werkzaamheden met gg-VEEV-SPDV, gg-SPDV-AQUA en gg-SPDV-SPDV plaats kunnen op ML-I, mits de cellijnen die gehanteerd worden vrij zijn van VEEV, SPDV of verwante virussoorten.

Referenties

1. Griffin DE (2013). Chapter 23, Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. Powers A *et al.* (2012). Family *Togaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam

3. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-Helper RNA System for Production of Recombinant Semliki Forest Virus Particles. *J. Virol.* 73: 1092–1098
4. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
5. Kinney RM *et al.* (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
6. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
7. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van Venezuelan equine encephalitis virus vaccinstam TC-83. COGEM advies CGM/170328-05
8. McLoughlin MF & Graham DA (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.* 30: 511-531
9. Jansen MD *et al.* (2017). The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge. *J. Fish Dis.* 40: 141-155
10. Boucher P (1995). PhD thesis, Université de Rennes, Rennes, France
11. Graham DA *et al.* (2007). Biophysical properties of salmonid alphaviruses (SAV) - influence of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.* 30: 533-544
12. COGEM (2010). Classificatie van vijf alphavirussen. COGEM advies CGM/101028-04
13. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van negen visvirussen. COGEM advies CGM/170322-02
14. Clouthier SC *et al.* (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 83: 421-428
15. Eyngor M *et al.* (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *J. Clin. Microbiol.* 52: 4137-4146
16. Bacharach E *et al.* (2016). Characterization of a novel Orthomyxo-like virus causing mass die-offs of Tilapia. *MBio.* 7: 1-7
17. Kurita J & Nakajima K (2012). Megalocytiviruses. *Viruses* 4: 521-38
18. De Groof A *et al.* (2015). A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. *PLoS Pathog.* 7: e1005074
19. Markussen T *et al.* (2015). Sequence analysis of the genome of *Piscine orthoreovirus* (PRV) associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE* 8: 1-12
20. Mori K *et al.* (1992). Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* 187: 368-371
21. Nishizawa T *et al.* (1997). Genomic Classification of Fish Nodaviruses by Molecular Phylogenetic Analysis of the Coat Protein Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1633-1636
22. Johansen R *et al.* (2004). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.* 27: 591-601
23. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van Venezuelan equine encephalitis virus. CGM/160815-01

24. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. CGM/160906-02
25. COGEM (2017). Omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
26. COGEM (2017). Vervolgadviesvraag VEEV replicons en noodzaak RCV test. COGEM advies CGM/170322-03
27. Rose NF *et al.* (2014). In vitro evolution of high-titer, virus-like vesicles containing a single structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 16866–16871
28. van den Pol AN *et al.* (2017). Chikungunya, Influenza, Nipah, and Semliki Forest Chimeric viruses with Vesicular Stomatitis Virus: Actions in the brain. *J. Virol.* 91 pii: e02154-16
29. Rolls MM *et al.* (1994). Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79: 497-506
30. Hikke MC *et al.* (2014). Salmonid alphavirus glycoprotein E2 requires low temperature and E1 for virion formation and induction of protective immunity. *Vaccine* 32: 6206-6212
31. Suomalainen M *et al.* (1992). Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J. Virol.* 66: 4737-4747
32. Jose J *et al.* (2012). Interactions of the cytoplasmic domain of Sindbis virus E2 with nucleocapsid cores promote alphavirus budding. *J. Virol.* 86: 2585-2599