

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

**DATUM** 27 augustus 2018  
**KENMERK** CGM/180827-02  
**ONDERWERP** Advies inschaling van werkzaamheden met gg-Rabiës virus

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 16-330\_2.8-002 getiteld 'Het gebruik van gerecombineerd Rabiës virus voor neurale tracing', ingediend door het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

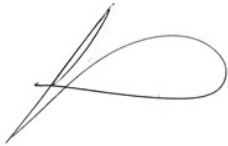
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg)-rabiësvirus (RABV) vector. Deze vector is afgeleid van een vaccinstam van het rabiësvirus. In de vector is het gen dat codeert voor het G-eiwit, dat betrokken is bij infectie, verwijderd. Aan het vectordeeltje is het EnvA eiwit afkomstig van *Avian leukosis virus* toegevoegd, waardoor de vector genetisch gemodificeerde zoogdiercellen kan infecteren. De aanvrager verzoekt hierbij de open handelingen, de toediening van de vector aan verschillende (genetisch gemodificeerde) knaagdieren via een stereotact, buiten een veiligheidskabinet uit te voeren.

Het rabiësvirus kan bij zoogdieren ernstige ziekte veroorzaken. De vaccinstam van dit virus wordt al langere tijd toegepast voor vaccinatiedoeleinden en is veilig en effectief gebleken in dieren. Deze vaccinstam is eerder door de COGEM in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld. Door afwezigheid van het G-gen is de vector replicatie-incompetent. De EnvA vectordeeltjes kunnen geen mensen en andere (niet-genetisch-gemodificeerde) zoogdieren infecteren.

Op basis van de bovenstaande overwegingen kan de COGEM instemmen met de inschaling op inperkingsniveau ML-II en de voorgenomen werkzaamheden buiten het veiligheidskabinet. Indien deze werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's 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 IenW

*Met het oog op eventuele belangenverstremeling zijn de COGEM leden prof. dr. C. M. F. Dirven en dr. S. Herfst niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Inschaling van werkzaamheden met EnvA gepseudotypeerd gg-rabiësvirus buiten het veiligheidskabinet

## COGEM advies CGM/180827-02

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-)rabiësvirusvector (IG 16-330). De vector is afgeleid van de vaccinstam SAD-B19. Voor de productie van de vector wordt in deze vaccinstam het G-eiwit gen gedeleteerd en wordt de vector gecomplementeerd met EnvA afkomstig van het *Avian leukosis virus*. De aanvrager wil de gepseudotypeerde gg-rabiësvirusvector via een stereotact toedienen aan verschillende (gg-)knaagdieren buiten het veiligheidskabinet (VK-II).

### 2. Rabiës virus

Het *Rabies lyssavirus* (RABV, voorheen Rabies virus<sup>1</sup>) behoort tot het genus *Lyssavirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*. Het virus heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 12kb. Het virusgenoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het 'nucleoprotein' (N-eiwit), het 'phosphoprotein' (P-eiwit), het 'matrixprotein' (M-eiwit), het 'glycoprotein' (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).<sup>2,3</sup> Het G-eiwit zorgt voor de binding van het virus aan en infectie van de gastheercellen, en speelt een belangrijke rol in de pathogeniteit van het virus. Na infectie met RABV treedt er een afweerreactie op, die met name gericht is tegen het G-eiwit.

Infectie met het RABV heeft een zeer hoge letaliteit. Het RABV is neurotroop en leidt in mensen en andere zoogdieren tot een ernstige ziekte, die rabiës of in de volksmond hondsdolheid wordt genoemd. Besmetting treedt meestal op in niet-neuronaal weefsel, waar het virus zich kan vermenigvuldigen. Na deze eerste ronde van replicatie verspreidt het zich naar de neuronen en naar de hersenen, wat tot hersenontsteking leidt. In het begin van de ziekte treden over het algemeen weinig specifieke symptomen op als koorts, verminderde eetlust, misselijkheid, braken en hoofdpijn. Later treden zenuwverschijnselen op als krampen, verlammingen, nekstijfheid, hyperactiviteit en stuipen. In het finale stadium treedt coma op leidend tot de dood.

Van nature vindt transmissie van RABV naar een mens plaats door contact met besmet speeksel ten gevolge van een beet (of krab) van een besmet dier. Er is in de wetenschappelijke literatuur enkele malen gerapporteerd dat RABV mogelijk via aerosolen is overgedragen als gevolg van laboratorium-werkzaamheden met RABV, of RABV besmet materiaal.<sup>4,5</sup> Er wordt algemeen aangenomen dat het RABV van nature niet van mens op mens overgedragen wordt.<sup>6</sup> Over het algemeen openbaren de eerste symptomen van ziekte zich na een incubatieperiode van gemiddeld één à twee maanden, maar afhankelijk van de plaats van de beet kan dit variëren.

### 3. Voorgenomen werkzaamheden

Voor de productie van de gg-vector wordt gebruik gemaakt van de RABV vaccinstam SAD-B19. Deze stam wordt in Europa sinds 1983 gebruikt voor de vaccinatie van vossen.<sup>7</sup> Uit veldproeven en laboratoriumonderzoek is deze vaccinstam veilig, stabiel en effectief gebleken.<sup>7,8</sup> In deze vaccinstam

wordt het gehele G-gen verwijderd (SAD-B19ΔG), waardoor de vector replicatie-incompetent wordt, omdat zonder het G-eiwit de vector geen zoogdiercellen kan infecteren. De vector wordt vervolgens gepseudotyperd met het EnvA eiwit afkomstig van 'Avian sarcoma leukosis virus (ASLV)<sup>a</sup>' subgroep A. Pseudotypering met het EnvA eiwit zorgt ervoor dat de vector niet in staat is om zoogdiercellen te infecteren en zijn neurotropisme verliest. Het EnvA glycoproteïne kan alleen cellen infecteren waarin de aviaire TVA receptor tot expressie komt.<sup>9</sup>

De aanvrager is voornemens de EnvA gepseudotyperde rabiësvirusvectoren toe te dienen aan (transgene) muizen, ratten en gerbils waarin TVA selectief tot expressie wordt gebracht in bepaalde celtypen. Omdat de open handelingen (stereotactische injecties) niet binnen een veiligheidskabinet uitgevoerd kunnen worden, vraagt de aanvrager om deze werkzaamheden buiten een veiligheidskabinet te mogen uitvoeren.

#### 4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft RABV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3.<sup>10,11,12</sup> Vaccinstam SAD-B19 heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>10</sup> In 2014 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met een rabiësvirusvaccin (ORA-DPC) afgeleid van SAD-B19 waarbij de aanvrager het vaccin toedient aan muizen, gevolgd door een 'challenge' met wildtype RABV. Deze vaccinatie-experimenten met volvirulent rabiësvirus werden ingeschaald op inperkingsniveau DM-III.<sup>12</sup> Bij deze aanvraag wilde de aanvrager de intracerebrale toediening van wildtype RABV buiten een veiligheidskabinet van klasse II uitvoeren, en heeft de COGEM de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Alle medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen RABV en moeten minimaal elke 6 maanden gecontroleerd worden op de aanwezigheid van een beschermende rabiësvirus antilichaamtiter;
- Alle medewerkers dragen volledig beschermende werkkleding inclusief handschoenen tot over de mouw van de werkkleding. De werkkleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- Het dragen van een goedpassend mond- en neuskapje (FFP3) en een veiligheidsbril of gelaatscherm is verplicht;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen;
- Betreffende dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Ook stemde de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Medewerkers dragen apart schoeisel. Dit schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- Bij het verlaten van de ruimte is de medewerker verplicht te douchen.

---

<sup>a</sup> De COGEM merkt op dat 'Avian sarcoma leukosis virus (ASLV)' subgroep A geen officieel erkende naam is volgens de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ASLV is een verzamelnaam voor Avian leukosis en sarcoma virusstammen die veel overeenkomsten vertonen. ICTV maakt onderscheid tussen het *Avian leukosis virus* (bestaande uit types A-E en J) en *Avian sarcoma virus CT10*. Onduidelijk is welke species er bedoeld wordt in de onderhavige aanvraag.

## 5. Overweging en advies

De aanvrager beschikt reeds over een vergunning om handelingen met kleine proefdieren in associatie met gg-rabiësvirusvectoren uit te voeren. In de voorliggende aanvraag wordt verzocht om open handelingen buiten het veiligheidskabinet van klasse II in te schalen.

### 5.1 Recombinatie

De productie van de EnvA gepseudotypeerde rabiësvirusvector wordt in het buitenland verzorgd. Ten behoeve van deze productie wordt eerst een G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ vector geproduceerd. In de onderhavige aanvraag is het G-eiwit afkomstig van vaccinstam SAD-B19. Door het SAD-B19ΔG genoomplasmide tegelijkertijd te transfecteren met een SAD-B19-G plasmide in een producer cellijn, worden vectordeeltjes geproduceerd die ‘gepseudotypeerd’ zijn met het eigen SAD-B19 G-eiwit. Deze G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ vectoren worden vervolgens gebruikt om een cellijn te infecteren waarin het EnvA *in trans* aangeboden wordt. Deze cellijn produceert de uiteindelijke EnvA gepseudotypeerde rabiësvirusvector. De producent test tijdens het productieproces niet op aanwezigheid van replicatiecompetent rabiësvirus. Er wordt wel getest op aanwezigheid van G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ rabiësvirusvectoren in de EnvA gepseudotypeerde vectorbatch, door te controleren of er infectie plaatsvindt in een cellijn waarin geen TVA tot expressie komt (293T cellen). De COGEM merkt op dat de uitvoerder geen nadere informatie aanlevert over de gevoeligheid van deze test.

De aanvrager meldt dat de plasmide die gebruikt wordt om het SAD-B19 G-gen tot expressie te brengen geen andere sequenties van het RABV genoom bevat, waardoor recombinatie met de SAD-B19 genoomplasmide tijdens de productie van de G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ vectoren zeer onwaarschijnlijk wordt geacht. De COGEM wijst er op dat de kans op recombinatie bij veel negatief-strengige RNA virussen zeer klein is. In de wetenschappelijke literatuur zijn weliswaar een aantal mutaties in negatief-strengs RNA virussen toegeschreven aan homologe recombinatie gebeurtenissen, maar dat is niet onomstreden.<sup>13</sup> De producent van de vector stelt dat er nog nooit replicatiecompetent rabiësvirus is ontdekt bij productiewerkzaamheden met de SAD-B19ΔG stam. De aanvrager geeft aan alleen werkzaamheden uit te voeren met EnvA gepseudotypeerde vectoren. De COGEM acht de kans op het ontstaan van replicatiecompetent gg-rabiësvirus verwaarloosbaar klein. De COGEM merkt op dat zelfs in het theoretische geval er homologe recombinatie plaatsvindt, de kans verwaarloosbaar klein is dat een recombinant ontstaat die pathogener is dan vaccinstam SAD-B19. De aanvrager stelt dat vectorbatches die tijdens de test op aanwezigheid van G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ rabiësvirusvectoren ‘leakage’ vertonen, niet gebruikt worden voor het experiment. Omdat de aanvrager geen informatie aanlevert over de gevoeligheid van de test kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat er G-eiwit ‘gepseudotypeerde’ vectordeeltjes in het eindproduct aanwezig zijn. Omdat deze rabiësvirusvectordeeltjes slechts eenmalig kunnen infecteren (door afwezigheid van het gen dat codeert voor het G-eiwit), acht de COGEM dit een risico voor de laboratoriummedewerker en is de kans op verdere verspreiding verwaarloosbaar klein.

### 5.2 Transmissie

Transmissie van RABV naar een mens vindt voornamelijk plaats door contact met besmet speeksel na een beet van een besmet dier. In enkele gevallen is tijdens laboratoriumwerkzaamheden RABV

overdracht door aerosolen gerapporteerd. In een eerder advies met werkzaamheden met wildtype en gg-rabiësvirus in dieren buiten het veiligheidskabinet heeft de COGEM daarom gewezen op het belang van maatregelen tegen handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan. In onderhavige adviesvraag heeft de aanvrager een aantal maatregelen genomen om aerosolvorming te voorkomen. Zo wordt de glazen pipet die gebruikt wordt voor de stereotactische injectie gevuld in het veiligheidskabinet, dragen medewerkers laboratoriumjassen, mondkapjes, handschoenen en veiligheidsbrillen, en heerst er een onderdruk in de ruimte waar de injecties worden uitgevoerd. Transmissie door een prikincident kan ook niet uitgesloten worden. Echter, volgens de aanvrager kan de pipet die gebruikt wordt voor de intracerebrale injecties niet door handschoenen prikken. De COGEM wijst erop dat de EnvA gepseudotyperde rabiësvirusvectoren bij eventuele blootstelling door prikincidenten of via aerosolen geen medewerkers kunnen infecteren door afwezigheid van de TVA receptor in zoogdiercellen.

### **5.3 Inschaling**

Door afwezigheid van het G-gen is de gg-rabiësvirusvector replicatie-incompetent. Pseudotypering met EnvA van ALV zorgt er voor dat er een 'single round of infection' kan plaatsvinden in (gg-)dieren die het TVA tot expressie brengen. De COGEM stemt in met een inschaling op ML-II inperkingsniveau en zij is van oordeel dat open handelingen (stereotactische injecties) met deze gg-rabiësvirusvector gezien de mate van biologische inperking buiten het veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd kunnen worden. Naast de standaard geldende maatregelen voor activiteiten met kleine zoogdieren in associatie met gg-virussen op inperkingsniveau DM-II (zoals het dragen van handschoenen), kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager genoemde aanvullende voorschriften ter bescherming van de medewerker:

- het dragen van een mond-neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een beschermende bril tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- De injectiespuit wordt in een ML-II ruimte in een veiligheidskabinet van klasse II gevuld en in een gesloten breukvaste, lekdichte houder die voor het vervoer uitwendig is ontsmet naar de DM-II ruimte gebracht;
- De vorming van aerosolen wordt zoveel mogelijk voorkomen.

Indien de voorgenomen werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.

### **Referenties**

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV Taxonomy history: Rabies lyssavirus. [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20171733](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20171733) (bezocht: 7 augustus 2018)
2. Lyles DS *et al.* (2013). Rhabdoviridae. In: Fields Virology 6th edition. Ed. Knipe MD and Howley PM, Lippincott Williams And Wilkins, Philadelphia: 886-922
3. Wickersham IR *et al.* (2010). Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. Nat. Protoc. 5: 595-605

4. Gibbons RV (2002). Cryptogenic Rabies, Bats, and the question of aerosol transmission. *Ann. Emerg. Med.* 39: 528-536
5. Johnson N *et al.* (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *J. Med. Microbiol.* 55:785-790
6. Helmick CG *et al.* (1987). Is there a risk to contacts of patients with rabies? *Rev. Infect. Dis.* 9: 511-518
7. Conzelmann K *et al.* (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated Rabies virus SAD B19. *Virology* 175:485-499
8. Vos A *et al.* (1999). An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species. *Epidemiol. Infect.* 123: 165-175
9. Young JAT (1998). Avian leukosis virus-receptor interactions. *Avian Pathology* 27: S1, S21-S25
10. COGEM (2002). Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken. COGEM advies CGM/020318-06
11. COGEM (2010). Classificatie van drie lyssavirussen. COGEM advies CGM/101109-03
12. COGEM (2014). Inschaling van *in vivo* werkzaamheden met gg-rabiësvirusvaccin. COGEM advies CGM/140903-03
13. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3: 1358-1373