

Advies betreffende: **Onderzoek aan dengue virussen en dengue virus vaccin kandidaten**

Kennisgever: **Erasmus Universiteit Rotterdam**

COGEM kenmerk
CGM/020823-03

BGGO nummer
BGGO 02-085

Datum advies
3 september 2002

Inleiding

Het betreft onderzoek aan het dengue virus, met name gericht op de vaccinontwikkeling tegen het betreffende virus. Infecties met het dengue virus, welke overgebracht worden door de tropische *Aedes aegypti* mug, verlopen meestal asymptomatisch. In een aantal gevallen kunnen zich echter ziekteverschijnselen voordoen die variëren van griepachtige symptomen tot een fatale aandoening die wordt gekarakteriseerd door bloedingen en shock (dengue hemorrhagische koorts/ dengue syndroom). Dengue virussen behoren tot de Flavivirussen (positief-strengige RNA-virussen met envelop). Van het dengue virus komen 4 serotypen voor (DEN 1 t/m 4). Voor het onderzoek worden alle 4 serotypen in vitro geproduceerd middels transfectie van genomische RNA transcripten afkomstig van in vitro getranscribeerde full-length cDNA klonen van de virussen. De geproduceerde virussen worden gebruikt voor in vitro infectie experimenten in zoogdiercellen en voor het uitlezen van dengue-specifieke T cel responsen middels kortdurende standaard assays (FACS, ELISPOT en proliferatie). Voor deze assays zal tevens recombinant vaccinia virus (VV) en modified vaccinia virus Ankara (MVA) worden vervaardigd waarmee individuele dengue virus eiwitten tot expressie zullen worden gebracht. Recombinant MVA zal daarnaast worden gebruikt in vaccinatie-experimenten in muizen en apen (*Macaca fascicularis*, stam cynomolgus), die vervolgens zullen worden gechallenged met wildtype dengue virus.

Overweging en advies

De aanvragers beschrijven de productie van recombinant dengue- en vaccinia-virus. Hoewel het geen invloed heeft op de advisering betreffende de milieuveiligheid, signaleert de COGEM dat uit de aanvraag onvoldoende blijkt waarom de aanvragers voor hun experimenten gebruik willen maken van recombinant dengue virussen en niet van wildtype dengue virussen.

Het dengue virus behoort tot virussen van pathogeniteitsklasse 3. De genen en genproducten van de 4 bekende serotypen worden in de literatuur gedetailleerd beschreven (1,2). Het virusgenoom is ongeveer 11 kb groot en bevat een enkel open reading frame (ORF) dat codeert voor een polyproteïne dat co- en posttranslationeel wordt geprocessed in 3 structurele en ten minste 7 niet structurele eiwitten. Vaccinia is een virus van pathogeniteitsklasse 2.

Vervaardiging van genetisch gemodificeerd MVA en infectie van zoogdiercellen (onderdeel 6 en 7)

MVA is een sterk geattenuerde stam die slechts tot hoge titers kan worden opgegroeid in kippen embryo fibroblasten en baby hamster niercellen. MVA is niet in staat te repliceren in andere zoogdiercellijnen. Daarnaast is MVA apathogeen in immuundeficiënte proefdieren. MVA is bij meer dan 120.000 mensen zonder bijwerking als alternatief pokkenvaccin toegepast. Inschaling van De werkzaamheden met MVA worden op basis van een virus van pathogeniteitsklasse 2 met een insert van een virus van pathogeniteitsklasse 3 als donorsequentie conform de Regeling op C-I ingeschaald. In een eerder advies (CGM/960501-01) heeft de COGEM aangegeven dat de aanvullende voorschriften die zijn voorgeschreven voor werkzaamheden met de vaccinia WR stam voor werkzaamheden met de vaccinia MVA stam niet nodig zijn. De COGEM acht het niet noodzakelijk om van dit eerdere advies af te wijken. Een inschaling van de betreffende werkzaamheden op C-I niveau acht de COGEM toereikend om de veiligheid voor mens en milieu te kunnen waarborgen.

Transfectie van RNA t.b.v. virusproductie en infectie van zoogdiercellen al dan niet in combinatie met recombinant vaccinia virus of genetisch gemodificeerd MVA (onderdeel 8).

De in dit onderdeel beschreven experimenten betreffen werkzaamheden met volvirulent dengue virus van pathogeniteitsklasse 3. De werkzaamheden worden conform de Regeling ingeschaald op C-II.

Transmissie van dengue virussen geschiedt via een beet van geïnfecteerde muggen (*Aedes aegypti*). Deze mug komt in Nederland niet voor. Transmissie van mens op mens is nooit waargenomen. De COGEM acht ongewenste verspreiding van het virus derhalve enkel mogelijk door onzorgvuldig handelen van de medewerkers waardoor direct contact van het virus mogelijk is met beschadigde huid of slijmvlies.

Aërosolvorming als bron van mogelijke verspreiding en daarmee besmetting kan derhalve niet worden uitgesloten. De COGEM acht daarom het hanteren van onderstaande aanvullende voorschriften tijdens de werkzaamheden noodzakelijk..

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II te worden uitgevoerd.

Tijdens de experimentele handelingen zullen dengue- en vaccinia-virus samen in een celcultuur worden gebracht.

De kans op een eventuele interactie (recombinatie/complementatie) tussen dengue- en vaccinia-virus in één en dezelfde celacht de COGEM verwaarloosbaar klein. Derhalve acht de COGEM het vrijwel uitgesloten dat deze handelingen additionele risico's met zich mee brengen Voor werkzaamheden in associatie met recombinant vaccinia virus (VV) gelden de volgende aanvullende voorschriften.

- De volgende medewerkers worden uitgesloten van deelname aan het betreffende experiment:

- medewerkers die lijden aan eczeem of medewerkers die in hun naaste omgeving te maken hebben met lijdens aan eczeem;
- medewerkers die zwanger zijn;
- medewerkers met een niet goed functionerend immuunsysteem;
- medewerkers die seropositief zijn voor HIV.

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen tot over de mouw van de laboratoriumjas.

Handelingen met proefdieren in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen: vaccinatie met MVA (onderdeel 9) en challenge experimenten met het dengue virus (onderdeel 10 en 11)

Om verspreiding en ongewenste besmetting middels aërosol-vorming te voorkomen dienen de met MVA besmette dieren (muizen) te worden gehuisvest in filtertopkooien welke zich bevinden in een D-II verblijf.

Apen dienen in een onderdruk isolator gehuisvest te worden (D-II inperkingniveau). De dieren die, al dan niet na vaccinatie met MVA, gechallengeed worden met dengue virus dienen gehuisvest te worden in onderdruk isolatoren (D-II inperkingniveau).

De COGEM overweegt een onderzoek uit te voeren naar het gebruik van onderdrukisolatoren. De COGEM acht het niet uitgesloten dat een technisch probleem zou kunnen ontstaan tijdens het voeren, behandelen, bemonsteren en verschonen van de proefdieren. Dit zou eventueel tot gevolg kunnen hebben dat de milieuveiligheid onvoldoende gegarandeerd kan worden. Daarnaast signaleert de COGEM dat een langdurige huisvesting van apen in dergelijke isolatoren zou kunnen leiden tot een situatie die ethisch niet acceptabel is, en zodoende een zaak voor de DEC is voor een nader oordeel.

Handelingen met cellen en weefsels afkomstig uit proefdieren (onderdeel 12 en 13)

Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van proefdieren welke geïnficeerd zijn met genetisch gemodificeerd MVA met een insert van een virus van pathogeniteitsklasse 3 als donorsequentie, dienen conform de Regeling uitgevoerd te worden op C-I niveau.

Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van proefdieren welke geïnficeerd zijn met recombinant dengue virus dienen uitgevoerd te worden op C-II niveau. Hierbij dienen onderstaande aanvullende voorschriften te worden gehanteerd:

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II te worden uitgevoerd.

¹ Puri et al. Virus Genes 20: 1, 57-63 (2000)

² Polo et al. Journal of Virology 71: 7, 5366-5374 (1997)