

Advies betreffende: **Biologische karakterisatie van Felineherpes virus 1 (FHV1) als vector voor Feline immunodeficiency virus (FIV) genen**

Kennisgever: **Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid**

COGEM kenmerk
CGM/030624-01

BGGO nummer
GGO 03-091

Datum advies
24 juni 2003

Inleiding

Aan de COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de inschaling van handelingen ten behoeve van onderzoek gericht op de vaccinontwikkeling tegen het *Feline immunodeficiency virus* (FIV) met gebruikmaking van een *Feline herpesvirus 1* (FHV1) vector.

FIV is een retrovirus dat immunodeficiëntie veroorzaakt bij katachtigen (*Felidae*), vergelijkbaar met het humane aidsvirus (HIV). Na een lange asymptomatische periode ontstaan door niet functioneren van het immuunsysteem infecties die uiteindelijk tot de dood leiden. Infectie met FIV vindt doorgaans plaats via vecht- en bijtonden. Ook vindt overdracht door seksueel contact en in beperkte mate via speeksel plaats.

FHV1 is een alfaherpesvirus dat bij katachtigen luchtweginfecties veroorzaakt. Naast luchtweginfecties worden ook oogontstekingen, levernecrosis, vaginale ontstekingen, huidzweren en abortus waargenomen. Na een acute fase van 3 tot 8 dagen, waarbij 20% van de katten komt te overlijden, blijft het virus levenslang latent aanwezig in de zenuwknopen van het geïnfecteerde weefsel. Door stress kan het FHV1 gereactiveerd en uitgescheiden worden. Transmissie van FHV vindt plaats door uitscheiding vanuit ogen, neus en mond (niezen en hoesten) en door direct contact met geïnfecteerde dieren.

Constructie van de recombinante vectoren

FHV1 heeft een dubbelstrengs DNA genoom welke codeert voor circa 70 genen. De expressievector is afgeleid van wildtype FHV1, waarbij een deletie aangebracht is in het thymidine kinase (*tk*) gen met als doel het virus te attenueren (verzwakken). Het *tk* gen draagt bij aan de virulentie van het virus. In de plaats van het *tk* gen zijn de *env* en *gag* genen van FIV geïnserteerd. Het resultaat is twee herpesvectoren die FIV genen tot expressie brengen. Het FIV *env* gen codeert voor een viraal glycoproteïne dat een rol speelt bij de aanhechting aan, en de infectie van het FIV van de gastheer cel. Het FIV *gag* gen speelt een rol bij de capsidvorming en het inkapselen van het retrovirale RNA.

Beide recombinante virussen dienen als vaccin tegen de verschijnselen van een FIV infectie en worden daartoe als een mix (1:1) toegediend.

Doel van het onderzoek

De onderhavige aanvraag betreft de *in vitro* en *in vivo* karakterisatie van recombinante FHV1- virussen als vaccin tegen FIV bij katten. Doel van het onderzoek is om de effectiviteit, veiligheid en verspreiding naar niet-gevaccineerde dieren van beide recombinante virussen te bestuderen.

Overweging

Virulentie

Een functioneel *tk* gen is niet essentieel voor replicatie van FHV *in vitro*. Uit literatuurgegevens blijkt dat in cellen geïnfecteerd met FHV, waarbij het *tk* gen gedeleteerd is, geen verminderde replicatie ten opzicht van het wildtype virus wordt gevonden. Ook heeft insertie van het FIV*gag* gen geen invloed op de virus replicatie *in vitro* (3). Na vaccinatie in katten met dit recombinante virus is een verminderde virulentie geconstateerd. Ondanks een hoge concentratie aan recombinant virus in oog,- neus en mondvocht zijn geen ziektesymptomen en geen uitscheiding van FHV1 waargenomen (2). De recombinante virussen zijn nog steeds replicatie-competent maar de mogelijkheid tot verspreiding is gering.

Gastheer(cel)tropisme

Voor zowel FHV1 als FIV geldt dat alleen dieren behorende tot de familie der *Felidae* worden geïnfecteerd. Verandering van het gastheerbereik bij gebruik van recombinante FHV/FIV-virussen wordt om die reden niet verwacht.

FHV infecteert hoofdzakelijk de cellen van de bovenste luchtwegen en van de geslachtsorganen. Daarnaast blijkt een gevoeligheid voor FHV1-infectie van cellen in de lymfeklieren van het halsgebied, in de tonsillen en in vruchtvliezen, en kan FHV1 T-lymfocyten infecteren. FIV-infecties vinden plaats in het beenmerg, lymfeklieren, thymus en milt, waarbij hoofdzakelijk de T-lymfocyten worden geïnfecteerd (1).

De mogelijkheid dat het FIV*env* eiwit in het recombinante virusdeeltje terecht komt is waarschijnlijk. Het FIV*env* gen speelt een rol bij de aanhechting van het FIV aan de gastheercel. Een mogelijk effect van de expressie van het FIV*env* gen kan de verandering van het spectrum van infecteerbare cellen (celtropisme) zijn, waardoor de kans op infectie van T-lymfocyten wordt vergroot. Daar hier sprake is van een geattenuëerd virus waarvoor geconstateerd is dat uitscheiding vanuit ogen, neus en mond niet aantoonbaar is (2), is het niet waarschijnlijk dat dit zal leiden tot een verhoogd risico voor mens en milieu.

Het FIV *gag* gen is betrokken bij de capsidvorming en het inkapselen van het retrovirale RNA. Uit literatuurgegevens blijkt dat expressie van het *gag*-eiwit plaats vindt, maar dat het *gag* 'precursor' eiwit ondanks de aanwezigheid van het protease gen niet omgezet wordt in functioneel eiwit zoals voor het wildtype het geval is (2; 3). Dit maakt

een mogelijke uitbreiding van het gastheercelbereik na infectie met FHV, waarin het FIVgag gen gekloneerd is, zeer onwaarschijnlijk.

Recombinatie

Uit literatuurgegevens blijkt dat replicatie van FHV1-recombinanten in geïnfecteerde katten wordt onderdrukt door de immuunreactie van deze katten na vaccinatie (2). Het 'challenge' virus (wildtype FIV) wordt enkele weken na de laatste vaccinatie toegediend. De recombinante virussen zijn in dat stadium slechts latent aanwezig in de zenuwknopen. Gezien het gastheertropisme van FIV is het onwaarschijnlijk dat gelijktijdige replicatie van zowel het recombinant virus als FIV plaats zal vinden in dezelfde cel.

Het FHV1 is een DNA-virus en het FIV een RNA-virus met slechts een korte DNA-fase tijdens een deel van de replicatiecyclus. Dit verlaagt de kans op uitwisseling van genetisch materiaal tussen het wildtype FIV en de recombinante virussen. Daarbij zal een recombinatiegebeurtenis in principe niet resulteren in een meer virulent virus dan het wildtype virus, ondanks dat de FIVenv en FIVgag genen afkomstig zijn van een andere stam dan het 'challenge' virus.

Advies

Het gaat hier om werkzaamheden met FHV1 en FIV die beide behorende tot pathogeniteitsklasse 2.

De inschaling van handelingen ten behoeve van onderzoek gericht op de vaccinontwikkeling tegen het *Feline immunodeficiency virus* waarvoor aan de COGEM gevraagd wordt advies uit te brengen bestaat uit drie onderdelen: onderdeel 1: Infecties *in vivo* van kattencellen, onderdeel 2: Handelingen met genetisch gemodificeerde organismen; vaccinatie van katten en 'challenge' met wildtype FIV en onderdeel 3: Handelingen met cellen en weefsels van de dieren uit onderdeel 2.

Onderdeel 1:

Onderdeel 1 betreft *in vitro* infecties van kattencellen met de recombinante herpesvectoren die FIV genen tot expressie brengen.

De COGEM is van mening dat de kans op uitbreiding van het gastheercelbereik door insertie van het gag gen in het FHV1 genoom zeer onwaarschijnlijk is. Insertie van het env gen in het FHV1 genoom kan leiden tot een verhoogde infectie van T-lymfocyten. Daar hier sprake is van een geattenuerd virus is het niet waarschijnlijk dat dit leidt tot een verhoogd risico voor mens en milieu. Op grond van de beschikbare gegevens is de COGEM van mening dat voor de beoogde werkzaamheden een inschaling op C1-niveau op basis van pathogeniteitsklasse 2, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein maken.

Onderdeel 2:

Onderdeel 2 betreft de vaccinatie van katten gevolgd door toedienen van wildtype FIV, waarbij de transmissie naar niet gevaccineerde katten wordt bekeken.

De COGEM is gezien bovengenoemde overwegingen van mening dat voldoende aannemelijk is dat de kans op recombinate van de recombinante virussen en het wildtype FIV virus verwaarloosbaar klein is. De COGEM stemt in met een inschaling op DII niveau zoals voorgesteld door Bureau GGO, met in achtneming de aanvullende voorschriften aangaande de huisvesting van de katten, maatregelen ter bescherming van de verzorgers en verwerking van besmet materiaal.

Voorts wil de COGEM wijzen op een onduidelijkheid in onderdeel 2 van de vergunning. In de aanvullende voorschriften wordt vermeld dat direct na afloop van het experiment de katten gedood, in afgesloten containers afgevoerd en verbrand moeten worden. Hierdoor is echter de uitvoering van onderdeel 3 niet mogelijk. De COGEM acht het meer relevant om bij onderdeel 2 aan te geven hoe transport van de DII-ruimte naar CI plaats zou moeten vinden en aanvullende voorschriften met betrekking tot afvoer te vermelden onder onderdeel 3.

Onderdeel 3:

Onderdeel 3 betreft handelingen met cellen en weefsels van katten uit onderdeel 2.

De COGEM acht het voldoende aannemelijk dat de kans op recombinate van de recombinante virussen en het wildtype FIV virus verwaarloosbaar klein is. De COGEM stemt in met een inschaling op CI niveau zoals voorgesteld door Bureau GGO. Voorts adviseert de COGEM de aanvullende voorschriften uit te breiden met een voorschrift ten aanzien van afvoer van de gebruikte kadavers.

Signalering

Gezien de allerwegen gedeelde ethische-maatschappelijke bedenkingen tegen dierproeven met katten, wil de COGEM wijzen op het grote belang van transparantie en openheid. De COGEM signaleert dat in de huidige procedure de argumenten en oordeelsvorming door de Dierexperimentencommissie (DEC) voor de burger niet voldoende openbaar beschikbaar zijn. Betere toegankelijkheid van de gemaakte keuzen en de achterliggende redenen acht de COGEM bij deze problematiek in de toekomst wenselijk.

Dit is in lijn met een eerdere signalering (CGM/021216-03) waarin de transparantie en openbaarheid van de besluitvorming van de DEC's zijn behandeld.

1. Rogers, A. B., Mathiason, C. K., and Hoover, E. A. (2002). Am J Pathol **161**, blz. 1143-51.

2. Sato, E., Miyazawa, T., Nishimura, Y., Ikeda, Y., Kawakami, K., Mochizuki, M., Yokoyama, N., Maeda, K., Fujita, K., Kohmoto, M., Takahashi, E., and Mikami, T. (2001). Arch Virol **146**, blz. 379-87.

3. Sato, E., Yokoyama, N., Maeda, K., Inoshima, Y., Kohmoto, M., Ikeda, Y., Miyazawa, T., and Mikami, T. (98). Arch Virol **143**, blz. 453-66.