

Advies betreffende: **Classificatie van geattenueerde pokkenvirusstammen**

Kennisgever:

COGEM kenmerk
CGM/030922-04

BGGO nummer

Datum advies
1 oktober 2003

Inleiding

Op 26 mei jl. heeft de COGEM advies (CGM/030519-06) uitgebracht betreffende de classificatie van geattenueerde pokkenvirusstammen en bijbehorende aanvullende voorschriften. In het betreffende advies zijn de vacciniavirussen WR, MVA ('modified vaccinia virus Ankara'), NYVAC (afgeleid van 'Copenhagen' vacciniastam), en de avipoxvirussen ALVAC (kanariepokkenvirus) en TROVAC (kippenpokkenvirus) behandeld. Deze virussen worden op dit moment gedefinieerd als pathogeniteitsklasse 2 virussen. De COGEM heeft in het betreffende advies (CGM/030519-06) de pathogeniteitsklasse evenals de gestelde aanvullende voorschriften bijgesteld, mede op basis van toegenomen inzicht en opgedane ervaring met deze virussen. De COGEM heeft geadviseerd om MVA, NYVAC, ALVAC en TROVAC in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1), aangezien voldoende is aangetoond dat deze virussen hun virulentie verloren hebben en onschadelijk zijn gebleken bij toepassing in mens en dier (1, 2, 4-13). Tevens heeft de COGEM geadviseerd om de indeling in klasse 2 te handhaven voor de WR stam met inachtneming van aanvullende voorschriften, gezien het feit dat deze stam niet zo sterk geattenueerd is als bijvoorbeeld MVA.

Naar aanleiding van bovengenoemd COGEM advies (CGM/030519-06) heeft het Bureau GGO aanvullende vragen gesteld die van belang zijn om de in het advies voorgestelde indelingen te kunnen toepassen. Onderstaand zullen de naar voren gebrachte aandachtspunten puntsgewijs beantwoord worden.

Overwegingen en Advies

De eerste vraag van Bureau GGO heeft betrekking op de consequenties van de indeling van een virusstam zoals MVA in pathogeniteitsklasse 1. Kan volgens deze indeling in pathogeniteitsklasse 1 met MVA gewerkt worden onder de fysische inperking en onder toepassing van de werkvoorschriften van ML-I (VMT) en DM-I ("D-II-laag") zonder aanvullende voorschriften? Dit zou volgens het Bureau GGO kunnen betekenen dat met een vervaardigde virusstock open werkzaamheden worden verricht buiten het

veiligheidskabinet, waarbij een zekere mate van aërosolverbreiding wordt geaccepteerd.

De risico's van apathogene micro-organismen¹, waartoe pathogeniteitsklasse 1 micro-organismen behoren, is volgens de COGEM uitermate gering. MVA is een sterk geattenuëerde vacciniastam die niet meer in staat is om in mensen of andere zoogdieren te repliceren (1-5). De COGEM is van mening dat bij pathogeniteitsklasse 1 micro-organismen een geringe aërosol-verspreiding acceptabel is, aangezien dergelijke micro-organismen apathogeen zijn. Werkzaamheden met pathogeniteitsklasse 1 micro-organismen zullen geen verhoogde risico's voor laboratoriummedewerkers en de omgeving met zich mee brengen ten opzichte van dezelfde werkzaamheden in bijvoorbeeld een veiligheidskabinet. Handelingen met deze micro-organismen in laboratoria met inperkingniveau ML-I (VMT) of DM-I ("D-II-laag") zonder aanvullende voorschriften zullen derhalve de veiligheid voor mens en milieu voldoende waarborgen.

Vraag twee betreft grootschalige activiteiten met een genetisch gemodificeerde MVA stam. In kennisgeving GGO 03-006 zijn dergelijke activiteiten tot 100 liter beschreven en destijds door het ministerie van VROM ingeschaald op C-I niveau waarbij exclusiecriteria werden gegeven voor medewerkers. Tevens is in aanvullende voorschriften bepaald dat alle werkzaamheden moeten worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet waarbij het dragen van handschoenen tot over de mouw van de laboratoriumjas verplicht werd gesteld. Indeling van een virusstam als MVA in pathogeniteitsklasse 1 leidt tot inschaling van dergelijke grootschalige werkzaamheden op MI-I (GILSP), of bij volumina tot 100 liter, in een ML-I (VMT) laboratorium, waarbij adequate maatregelen genomen moeten worden gedurende de kweek en het 'downstream process'. Een van de vragen van het Bureau GGO is wat de voorschriften zijn voor de kweekomstandigheden en het 'downstream process' bij grootschalige activiteiten met MVA onder GILSP condities. Daarnaast is de COGEM verzocht om aan te geven of grootschalige werkzaamheden tot 100 liter uitgevoerd kunnen worden onder ML-I (VMT) omstandigheden en welke voorwaarden gesteld moeten worden aan de kweekomstandigheden en het 'downstream process'.

Pathogeniteitsklasse 1 micro-organismen zijn apathogeen en worden beschouwd als erkende gastheren. Dit betekent dat werkzaamheden met zogenaamde ongevaarlijke genen in erkende gastheren niet vergunningplichtig zijn. Slechts een meldingsplicht achteraf is vereist. De COGEM is van mening dat er tussen virussen en bacteriën aanzienlijke verschillen bestaan op het gebied van levenscyclus, pathogeniteit, infectiecyclus e.d., waardoor een adequate risico-analyse van belang is. Dientengevolge kunnen de onderhavige pokkenvirusstammen niet als erkende gastheren beschouwd worden. Bij grootschalige werkzaamheden met pathogeniteitsklasse 1 virussen zullen aangepaste veiligheidsmaatregelen genomen moeten worden voor bijvoorbeeld de kweekomstandigheden en het 'downstream process'. Gezien het feit dat de COGEM nog

¹ Alhoewel de COGEM zich ervan bewust is dat virussen geen micro-organismen zijn, worden in dit advies virussen, conform de bedoeling van de wetgever, tot de micro-organismen gerekend.

in beraad is over deze problematiek, zal in een vervolgadvis nader worden ingaan op de indeling van apathogene virussen in pathogeniteitsklasse 1, waarbij grootschalige werkzaamheden en eventuele aanvullende maatregelen aan bod zullen komen.

De derde vraag van het Bureau GGO betreft de indeling van de NYVAC stam in pathogeniteitsklasse 1. In een eerder advies van de COGEM (CGM/960304-02) uit 1996 zijn werkzaamheden met de NYVAC stam ingeschaald op C-I niveau. In het desbetreffende advies is volgens het Bureau GGO een vergelijkbare beschrijving gegeven van de eigenschappen van de NYVAC stam op grond waarvan in het recente COGEM advies (CGM/030519-06) de betreffende pokkenvirusstam lager ingedeeld is. De vraag aan de COGEM is welke nieuwe gegevens tot deze indeling hebben geleid. Ten tijde van het advies (CGM/960304-02) uit 1996 waarin de NYVAC stam op C-I niveau werd ingeschaald, had de COGEM het standpunt ingenomen dat alle bij mens en dier voorkomende virussen pathogenen waren en derhalve ingedeeld moesten worden in minimaal pathogeniteitsklasse 2. Hoewel de beschreven eigenschappen van de NYVAC stam in het huidige COGEM advies (CGM/030519-06) niet zijn veranderd, is het inzicht en opgedane ervaring met de NYVAC stam in de afgelopen jaren toegenomen, zoals blijkt uit meer dan 42 wetenschappelijke publicaties sinds 1995 (6, 7, 14-20). Op basis hiervan hebben de leden van de COGEM de afweging gemaakt om NYVAC te beschouwen als een pathogeniteitsklasse 1 micro-organisme. Dit standpunt van de COGEM wordt mede ondersteund door het gezaghebbende 'Center for Disease Control' (CDC) in de Verenigde Staten en het 'National Institutes of Health' (NIH). Deze organisaties hebben de NYVAC stam ingeschaald in de laagste categorie, namelijk 'biosafety level' 1 (8-10).

De vierde vraag van het Bureau GGO heeft betrekking op de aanvullende voorschriften voor de WR stam zoals vermeld in advies CGM/030519-06. Op grond van welke gegevens en onderbouwing is de COGEM tot de conclusie gekomen dat bij laboratoriumhandelingen met de stam WR een aanvullend voorschrift moet worden gesteld dat beschermende handschoenen, neus en mondmaskers en een veiligheidsbril moeten worden gedragen, terwijl in het advies CGM/011029-02 deze eis niet wordt genoemd? De COGEM is bij nader inzien van mening dat aanvullend voorschrift III, waarbij medewerkers beschermende handschoenen, neus en mondmaskers en een veiligheidsbril moeten dragen, alleen van toepassing is voor werkzaamheden met recombinant WR in associatie met proefdieren en niet voor laboratoriumwerkzaamheden met de WR stam. Voor werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig uit geïnfecteerde dieren kan deze eis komen te vervallen gezien het feit dat vaccinia zich niet door de lucht kan verspreiden. Voor deze handelingen gelden dezelfde aanvullende voorschriften als voor laboratoriumwerkzaamheden met de WR stam aangevuld met de eis dat beschermende handschoenen en een veiligheidsbril gedragen moeten worden.

Vraag vijf betreft de eis tot ontsmetting van alle afvalwater. De aanvullende voorschriften die worden genoemd voor handelingen met de WR stam in associatie met proefdieren komen volgens het Bureau GGO neer op een zeer sterke versoepeling van de in een eerder COGEM advies (CGM/011029-02) gestelde voorschriften. De eis tot ontsmetting van alle afvalwater is in het recente COGEM advies (CGM/030519-06) namelijk komen te vervallen. Ontsmetting van afvalwater vereist over het algemeen ingewikkelde bouwkundige voorzieningen. Op grond van welke gegevens berust de versoepeling van de gestelde voorschriften?

De onderhavige eis tot ontsmetting van alle afvalwater, zoals beschreven is in het COGEM advies CGM/011029-02 uit 2001, is voor het eerst gesteld in het COGEM advies CGM/951206-21 uit 1995. In de bijbehorende kennisgeving (GGO 95-259) werden experimenten beschreven met apen die geïmmuniseerd werden met een recombinante WR stam. Het COGEM advies CGM/011029-02 heeft betrekking op een wijziging in de bestaande kennisgeving (GGO 95-259/2) waarbij experimenten met recombinant fowlpox virus uitgevoerd werden. De aanvullende eis tot ontsmetting van alle afvalwater is in het COGEM advies CGM/011029-02 gehandhaafd voor de WR stam vooruitlopend op de heroverweging van de uitsluitingscriteria en aanvullende voorschriften zoals in het recente COGEM advies behandeld zijn (CGM/030519-06). Deze eis is in het advies uit 1995 (CGM/951206-21) opgenomen mede op grond van het voorzorgsprincipe. In de afgelopen jaren is het inzicht en de opgedane ervaring toegenomen zoals blijkt uit de vele publicaties (22-28). Op grond hiervan heeft de COGEM besloten om de aanvullende eis tot ontsmetting van alle afvalwater te laten vervallen. Immers bedoelde eis zal niet substantieel bijdragen aan effectievere bescherming van mens en milieu.

Onderstaand zijn de aanvullende voorschriften voor werkzaamheden met de WR stam (CGM/030519-06) samengevat:

Werkzaamheden met de WR vacciniastam:

- I - De volgende medewerkers zijn uitgesloten van deelname aan activiteiten met de WR vacciniastam:
 - 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.

- II - Alle activiteiten die kunnen plaatsvinden in een veiligheidskabinet dienen te worden uitgevoerd in een klasse-II veiligheidskabinet, waarbij de medewerkers handschoenen dienen te dragen tot over de mouw van de laboratoriumjas. Indien de werkzaamheden niet binnen een veiligheidskabinet plaats kunnen vinden geldt aanvullend voorschrift III.

Voor werkzaamheden met WR vacciniastam in associatie met proefdieren gelden naast I en II de volgende aanvullende voorschriften:

- III** - Beschermende handschoenen, neus- en mondmaskers en veiligheidsbril worden gedragen.
- IV** - Het dierverblijf wordt goed schoongehouden. Na morsen van besmet materiaal worden besmette oppervlakken direct ontsmet.

Voor werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig uit proefdieren in associatie met recombinant WR gelden de aanvullende voorschriften I en II met daarbij:

- V** - Beschermende handschoenen en veiligheidsbril worden gedragen.

Voor activiteiten zoals het vervoeren of inspecteren van met de WR vacciniastam besmette dieren geldt alleen aanvullende voorschrift III en IV.

In de laatste vraag wordt de COGEM verzocht om aan te geven of ALVAC en TROVAC apathogeen voor dieren zijn. Indien deze stammen wat betreft hun dierpathogene eigenschappen niet kunnen worden beschouwd als behorend tot pathogeniteitsklasse 1, kunnen er dan overwegingen worden gegeven op grond waarvan besloten kan worden dat deze stammen zonder bezwaar voor de veiligheid van mens en milieu kunnen worden gebruikt op ML-I (VMT) en DM-I ("D-II-laag") niveau en moeten daarbij eventueel aanvullende voorschriften worden gehanteerd?

Zowel ALVAC als TROVAC zijn vaccinstammen die op grote schaal zijn toegepast om voor vogelpokken gevoelige dieren te beschermen (11, 12). Het 'National Institutes of Health' (NIH) alsmede het 'Center for Disease Control' (CDC) in de Verenigde Staten hebben ALVAC en TROVAC ingeschaald in de laagste 'biosafety' categorie. Deze sterk geattenueerde pokkenvirusstammen zijn niet in staat om te repliceren in zoogdiercellen (1). Tevens is bekend dat deze stammen avirulent zijn bij zowel normale als immuun-gecompromitteerde dieren (11-13). In vogels kunnen de onderhavige pokkenvirusstammen wel repliceren. De stammen worden als vaccin echter op grote schaal toegepast in bijvoorbeeld kippen zonder nadelige effecten (29). Hierdoor kan worden aangenomen dat ALVAC en TROVAC ook apathogeen zijn voor vogels. De COGEM is derhalve van mening dat beide stammen beschouwd kunnen worden als apathogeen voor zowel mensen en dieren waarvoor geen aanvullende voorschriften hoeven te worden gehanteerd.

Referenties

1. Moss, B. (1994). Replicating and host-restricted non-replicating vaccinia virus vectors for vaccine development. *Dev Biol Stand* **82**, blz. 55-63.
2. Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression,

vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, blz. 11341-8.

3. Spehner, D., Drillien, R., Proamer, F., Houssais-Pecher, C., Zanta, M. A., Geist, M., Dott, K., and Balloul, J. M. (2000). Enveloped virus is the major virus form produced during productive infection with the modified vaccinia virus Ankara strain. *Virology* **273**, blz. 9-15.

4. Stittelaar, K. J., Kuiken, T., de Swart, R. L., van Amerongen, G., Vos, H. W., Niesters, H. G., van Schalkwijk, P., van der Kwast, T., Wyatt, L. S., Moss, B., and Osterhaus, A. D. (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* **19**, blz. 3700-9.

5. Sutter, G. and Moss, B. (1995). Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* **84**, blz. 195-200.

6. Perkus, M. E., Taylor, J., Tartaglia, J., Pincus, S., Kauffman, E. B., Tine, J. A., and Paoletti, E. (1995). Live attenuated vaccinia and other poxviruses as delivery systems: public health issues. *Ann N Y Acad Sci* **754**, blz. 222-33.

7. Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et, a. I. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**, blz. 217-32.

8. National Institutes of Health. Appendix D-56 [NIH Guidelines]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1993. Internet: http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/Appendix_D.htm (9 september 2003).

9. National Institutes of Health. Modifications to NIH vaccinia immunization policy [Memorandum dated 8 Aug 1996]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1996.

10. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), June 22, 2001. MMWR 2001;50. No. RR-10. Internet: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/RR5010.pdf> (9 september 2003).

11. Paoletti, E., Taylor, J., Meignier, B., Meric, C., and Tartaglia, J. (1995). Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC. *Dev Biol Stand* **84**, blz. 159-63.

12. Taylor, J., Tartaglia, J., Riviere, M., Duret, C., Languet, B., Chappuis, G., and Paoletti, E. (1994). Applications of canarypox (ALVAC) vectors in human and veterinary vaccination. *Dev Biol Stand* **82**, blz. 131-5.

13 Tartaglia J, Cox WI, Taylor J, Perkus M, et al. (1992) IX. Live vectors as vaccines: highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, blz. 1445-7.

14. Hel, Z., Nacsa, J., Tsai, W. P., Thornton, A., Giuliani, L., Tartaglia, J., and Franchini, G. (2002). Equivalent immunogenicity of the highly attenuated poxvirus-based ALVAC-SIV and NYVAC-SIV vaccine candidates in SIVmac251-infected macaques. *Virology* **304**

, blz. 125-34.

15. Kanesa-thasan, N., Smucny, J. J., Hoke, C. H., Marks, D. H., Konishi, E., Kurane, I., Tang, D. B., Vaughn, D. W., Mason, P. W., and Shope, R. E. (2000). Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus--poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* **19**, blz. 483-91.
16. Kazanji, M., Tartaglia, J., Franchini, G., de Thoisy, B., Talarmin, A., Contamin, H., Gessain, A., and de The, G. (2001). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 NYVAC and naked DNA vaccine candidates in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol* **75**, blz. 5939-48.
17. Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R., and et, a. I. (1998). Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **177**, blz. 1664-73.
18. Patterson, L. J., Peng, B., Abimiku, A. G., Aldrich, K., Murty, L., Markham, P. D., Kalyanaraman, V. S., Alvord, W. G., Tartaglia, J., Franchini, G., and Robert-Guroff, M. (2000). Cross-protection in NYVAC-HIV-1-immunized/HIV-2-challenged but not in NYVAC-HIV-2-immunized/SHIV-challenged rhesus macaques. *AIDS* **14**, blz. 2445-55.
19. Raengsakulrach, B., Nisalak, A., Gettayacamin, M., Thirawuth, V., Young, G. D., Myint, K. S., Ferguson, L. M., Hoke, C. H. Jr, Innis, B. L., and Vaughn, D. W. (1999). Safety, immunogenicity, and protective efficacy of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV recombinant Japanese encephalitis vaccines in rhesus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* **60**, blz. 343-9.
20. Stephensen, C. B., Welter, J., Thaker, S. R., Taylor, J., Tartaglia, J., and Paoletti, E. (1997). Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* **71**, blz. 1506-13.
21. Stevceva, L., Alvarez, X., Lackner, A. A., Trynieszewska, E., Kelsall, B., Nacsa, J., Tartaglia, J., Strober, W., and Franchini, G. (2002). Both mucosal and systemic routes of immunization with the live, attenuated NYVAC/simian immunodeficiency virus SIV(gpe) recombinant vaccine result in gag-specific CD8(+) T-cell responses in mucosal tissues of macaques. *J Virol* **76**, blz. 11659-76.
22. Gaertner, D. J., Batchelder, M., Herbst, L. H., and Kaufman, H. L. (2003). Administration of vaccinia virus to mice may cause contact or bedding sentinel mice to test positive for orthopoxvirus antibodies: case report and follow-up investigation. *Comp Med* **53**, blz. 85-8.
23. Gherardi, M. M., Najera, J. L., Perez-Jimenez, E., Guerra, S., Garcia-Sastre, A., and Esteban, M. (2003). Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. *J Virol* **77**, blz. 7048-57.

24. Hakoda, E., Machida, H., Tanaka, Y., Morishita, N., Sawada, T., Shida, H., Hoshino, H., and Miyoshi, I. (1995). Vaccination of rabbits with recombinant vaccinia virus carrying the envelope gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* **60**, blz. 567-70.
25. Ibuki, K., Funahashi, S. I., Yamamoto, H., Nakamura, M., Igarashi, T., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., and Shida, H. (1997). Long-term persistence of protective immunity in cynomolgus monkeys immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the human T cell leukaemia virus type I envelope gene. *J Gen Virol* **78 (Pt 1)**, blz. 147-52.
26. Meiser, A., Boulanger, D., Sutter, G., and Krijnse Locker, J. (2003). Comparison of virus production in chicken embryo fibroblasts infected with the WR, IHD-J and MVA strains of vaccinia virus: IHD-J is most efficient in trans-Golgi network wrapping and extracellular enveloped virus release. *J Gen Virol* **84**, blz. 1383-92.
27. Ramirez, J. C., Gherardi, M. M., and Esteban, M. (2000). Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol* **74**, blz. 923-33.
28. Vemulapalli, R., Cravero, S., Calvert, C. L., Toth, T. E., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Rossetti, O. L., and Schurig, G. G. (2000). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, blz. 114-8.
29. Bureau Registratie Diergeneesmiddelen. Internet: <http://www.brd.agro.nl/> (17 september 2003).