

Advies betreffende: **Evaluatie van een *Yellow fever virus* (YFV) recombinant met M/E-geninsertie van het *West Nile virus* (WNV) in proefdieren**

Kennisgever: **Intervet International B.V.**

COGEM kenmerk
CGM/030930-04

BGGO nummer
GGO 03-089/1

Datum advies
1 oktober 2003

Inleiding

Het doel van de studie is om een vaccin te ontwikkelen voor paarden tegen het *West Nile virus* (WNV). Hiertoe wordt in de betreffende aanvraag een evaluatie uitgevoerd van een recombinant *Yellow fever virus* vaccin (YFV) met een M/E-geninsertie van het WNV in proefdieren.

Het YFV is een positief-strengig RNA virus welke behoort tot de familie van *Flaviviridae* (10). De gele koorts die door het virus veroorzaakt wordt is een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika ten zuiden van de Sahara en in Zuid-Amerika. Het virus wordt geregeld naar de mens overgebracht door de mug *Aedes aegyptii*. Bij de mens veroorzaakt de ziekte plotselinge koorts, hoofdpijn, rugpijn, misselijkheid, geelzucht en stoornissen in de nierfunctie. Daarbij kunnen bloedingen met name in de mond en darmen ontstaan. Het is een ernstige ziekte die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop kent. Er bestaat geen antiviraal medicijn tegen deze ziekte. Een effectieve langdurige bescherming is echter mogelijk middels vaccinatie met de geattenueerde YF-17D stam. De basis van de attenuering van deze stam is een aantal mutaties, verspreid over het gehele genoom (2; 8; 14). De YF-17D stam is 65 jaar geleden ontwikkeld en meer dan 350 miljoen mensen zijn er mee gevaccineerd (12).

Evenals het YFV behoort het WNV tot de familie van *Flaviviridae* en tot het genus *Flavivirus* (10). In 1937 werd het WNV voor het eerst in Oeganda ontdekt en is daarna ook gesignaleerd in Afrika, West-Azië, Oost-Europa en het Midden Oosten. In 2002 is een er uitbraak van het virus geweest in New York en sindsdien verspreidt de ziekte zich verder in de Verenigde Staten. Het WNV komt voor bij mensen, vogels en andere gewervelde dieren zoals katten, paarden, vleermuizen, wangzakeekhoorns en konijnen. Verspreiding van het virus vindt voornamelijk plaats via muggen (*Culex spp.*), terwijl trekvogels drager van het virus kunnen zijn (13). De verschijnselen van een infectie met het WNV zijn meestal lichte koorts, hoofdpijn, pijnen verspreid door het lichaam, huiduitslag en opgezwollen lymfeklieren. In sommige gevallen komt het virus in de hersenen terecht en ontstaat een vaak lethale encefalitis. Met name mensen boven de

vijftig lopen hierbij een groter risico. Een vaccin en effectieve profylaxe tegen het virus zijn niet voorhanden.

In de onderhavige experimenten wordt gebruik gemaakt van de humane geattenueerde vaccinstam van het YFV (YF-17D) waarin de structurele genen *prM* en *E* zijn uitgewisseld met de overeenkomstige genen van het WNV. Zowel de *prM* en *E* genen coderen voor oppervlakte-eiwitten die een rol spelen bij de immuniteit tegen het WNV (1; 6; 7). Het recombinante vaccin is in de Verenigde Staten ontwikkeld, getest en vervaardigd. In Nederland zal het vaccin volgens Europese richtlijnen getest worden op veiligheid en werkzaamheid in muizen en paarden. De dieren worden geënt met het recombinante virus en klinisch geobserveerd voor ziekteverschijnselen met name encefalitis. Na 4 tot 6 weken zullen de gevaccineerde dieren geïnfecteerd worden met een virus isolaat van het WNV om de beschermende werking van het vaccin aan te tonen.

Overwegingen en Advies

De COGEM is gevraagd om op basis van een door VROM afgegeven beschikking te adviseren of middels de gehanteerde classificering van het recombinante virus en de voorgeschreven inperkingsmaatregelen de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Zowel het YFV als het WNV behoren tot pathogeniteitsklasse 3 virussen, terwijl de vaccinstam YF-17D van het YFV een klasse lager wordt ingeschaald. Beide virussen zijn RNA virussen die tot dezelfde virusfamilie behoren (10). Vervanging van de structurele *prM* en *E* genen, door die van het *West Nile virus*, kan mogelijk een verandering in tropisme en replicatie veroorzaken. De opinie van de COGEM is dat de, door de aanvrager, verstrekte rapporten (4) met betrekking tot toediening bij paarden en apen geen uitsluitel geven over mogelijke veranderingen in tropisme. Daarbij ontbreken gegevens, zoals meervoudige passage studies, over de genetische stabiliteit van het recombinante vaccin. De COGEM adviseert dat het genetisch gemodificeerde *Yellow fever virus* gezien dient te worden als een vol virulent virus en deze, bij alle onderdelen van het experiment, in te schalen in pathogeniteitsklasse 3.

Vanwege de mogelijke aërosoltransmissie van het YFV bij de vaccinatie van paarden met het wildtype en het recombinante YFV heeft de vergunning verlenende instantie (Bureau GGO) het dragen van een persluchtmasker voorgeschreven. In de literatuur zijn weinig gegevens bekend over laboratorium-geassocieerde infecties van werknemers via aërosoltransmissie bij het gebruik van proefdieren (3). Er is slechts één studie bekend waar melding gemaakt wordt van laboratorium geassocieerde infecties. De mortaliteit van YFV infecties is hier ongeveer 20% (5). Uit dit artikel uit 1967 is echter niet op te

maken dat het hier gaat om aërosoltransmissie. Hierbij dient aangetekend te worden dat de manier waarop experimenten in die tijd werden uitgevoerd sterk verschilt van de huidige standaard praktijk. Het ontbreken van veiligheidskabinetten is hierbij een belangrijk verschil.

Sinds 1967 zijn er geen gevallen meer bekend van laboratorium-geassocieerde infecties van YFV bij laboratorium personeel. Ook heeft men het YFV nooit kunnen overbrengen met secreta of excreta van patiënten. De afwezigheid van het virus in deze producten maakt aërosoltransmissie niet waarschijnlijk en ook zijn er daarvoor nooit aanwijzingen gevonden. Bovendien is het gebrek aan spreidingsvermogen door aërosolen of excretie een eigenschap van de groep verwante flavivirussen waar WNV en YFV toe behoren. Dit maakt het onwaarschijnlijk dat een chimeer van het YFV en het WNV zich met betrekking tot het spreidingsmechanisme anders zal gedragen.

Derhalve is de COGEM van mening dat het dragen van een persluchtmasker hier niet noodzakelijk is. Het grootste risico voor de werknemers is de besmetting met bloed. Men kan zich hiertegen beschermen door het dragen van sluitende kleding, handschoenen een veiligheidsbril en een hoofddeksel. Met het oog op het ontstaan van eventuele bloedsprays kan bescherming van de luchtwegen plaatsvinden met behulp van een goedsluitend gezichtsmasker met eventueel een respirator.

Met betrekking tot de geplande 'challenge' experimenten wil de COGEM het volgende opmerken. Het is bekend dat bij flavivirussen recombinatie tussen twee isotypen van bijvoorbeeld het *Dengue virus* kan plaatsvinden (9-11). Dit is met name het geval indien het een hoge viremische infectie betreft over langere periodes. Recombinatie tussen het recombinant *Yellow fever virus* vaccin en het wildtype *West Nile virus* via het *E-* of *prM-* gen kan dus niet geheel uitgesloten worden. De kans hierop is echter zeer klein gezien het feit dat een gelijktijdige infectie van beide virussen in de onderhavige proefopzet niet zal voorkomen. Indien tijdens de 'challenge' experimenten recombinatie optreedt tussen nog aanwezig recombinant vaccin en het wildtype *West Nile virus* dan kunnen het *E-* met *prM-* gen uitgewisseld worden. Dit zal echter geen effect hebben op het fenotype van het recombinant *Yellow fever virus* vaccin of *West Nile virus* gezien beide genen afkomstig zijn van laatstgenoemde virus. Derhalve acht de COGEM de risico's voor mens en milieu als gevolg van eventuele recombinaties met wildtype *West Nile virus* verwaarloosbaar klein.

Over de geleverde risico-analyse, met betrekking tot het wildtype WNV, van de aanvrager wil de COGEM opmerken dat vanwege de gele koorts epidemieën in stedelijke gebieden in het verleden de mens zeer waarschijnlijk geen 'dead-end host' is. Stedelijke epidemieën zijn namelijk alleen mogelijk bij een effectieve mens-mug-mens cyclus. Of paarden een 'dead-end host' kunnen zijn is niet duidelijk. In de informatie van de aanvrager wordt gesuggereerd dat de virustiter in het bloed van de paarden te laag zou zijn om muggen te besmetten. De, door de aanvrager, gepresenteerde gegevens hebben echter betrekking op een klein aantal paarden, een enkele virusstam en maar

één muggensoort. De COGEM is dan ook van mening dat de aanwezige literatuur onvoldoende kan uitsluiten dat een paard als virusdonor kan optreden. De inperkingsmaatregelen zoals deze zijn voorgeschreven voor pathogeniteitsklasse 3 organismen zijn echter van dien aard dat het risico van besmetting met flavivirussen te verwaarlozen is. De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu middels deze indeling voldoende gewaarborgd blijft.

Referenties

1. Arroyo, J., Miller, C. A., Catalan, J., and Monath, T. P. (2001). Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol Med* **7**, blz. 350-4.
2. Arya, S. C. (2002). Yellow fever vaccine safety: a reality or a myth? *Vaccine* **20**, blz. 3627-8.
3. Borio, L., Inglesby, T., Peters, C. J., Schmaljohn, A. L., Hughes, J. M., Jahrling, P. B., Ksiazek, T., Johnson, K. M., Meyerhoff, A., O'Toole, T., Ascher, M. S., Bartlett, J., Breman, J. G., Eitzen, E. M. Jr, Hamburg, M., Hauer, J., Henderson, D. A., Johnson, R. T., Kwik, G., Layton, M., Lillibridge, S., Nabel, G. J., Osterholm, M. T., Perl, T. M., Russell, P., and Tonat, K. (2002). Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* **287**, blz. 2391-405.
4. Bunning, M. L., Bowen, R. A., Cropp, C. B., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., Godsey, M. S., Baker, D., Hettler, D. L., Holmes, D. A., Biggerstaff, B. J., and Mitchell, C. J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* **8**, blz. 380-6.
5. Hanson, R. P., Sulkin, S. E., Beuscher, E. L., Hammon, W. M., McKinney, R. W., and Work, T. H. (1967). Arbovirus infections of laboratory workers. Extent of problem emphasizes the need for more effective measures to reduce hazards. *Science* **158**, blz. 1283-6.
6. Johnson, B. W., Chambers, T. V., Crabtree, M. B., Arroyo, J., Monath, T. P., and Miller, B. R. (2003). Growth characteristics of the veterinary vaccine candidate ChimeriVax trade mark -West Nile (WN) virus in *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Med Vet Entomol* **17**, blz. 235-43.
7. Langevin, S. A., Arroyo, J., Monath, T. P., and Komar, N. (2003). Host-range restriction of chimeric yellow fever-West Nile vaccine in fish crows (*Corvus ossifragus*). *Am J Trop Med Hyg* **69**, blz. 78-80.
8. Monath, T. P. (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* **1**, blz. 11-20.

9. Twiddy, S. S. and Holmes, E. C. (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* **84**, blz. 429-40.
10. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
11. Worobey, M., Rambaut, A., and Holmes, E. C. (1999). Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 7352-7.
12. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/index.htm> (1 oktober 2003).
13. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/> (1 oktober 2003).
14. dos Santos, C.N., Post, P.R., Carvalho, R., Ferreira, I.I., Rice, C.M. and Galler, R. (1995). Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res* **35**, blz. 35-41.