

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 12 juli 2010
KENMERK CGM/100712-05
ONDERWERP Advies: Classificatie en inschaling werkzaamheden Orbivirussen

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 10-033 met de titel 'Moleculair virologisch onderzoek aan Orbivirussen' van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee:

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van enkele virussen uit het genus *Orbivirus*. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde Orbivirussen ingeschaald dienen te worden. Aanvrager werkt al met enkele blauwtong virusstammen (BTV) en wil deze werkzaamheden uitbreiden met andere virussen uit het genus *Orbivirus*. Het betreft het *Afrikaanse paardenpestvirus* (AHSV), *Enzootische haemorrhagische ziekte virus* (EHDV), *Equine encephalose virus* (EEV) en twee nog niet officieel bij het orbivirus ingedeelde serogroepen namelijk het *Toggenburgvirus* (TOV) en een virus isolaat uit Alpaca's.

AHSV, EDHV en EEV zijn verwant aan BTV en veroorzaken een soortgelijk ziektebeeld waarbij de ernst van de symptomen kan variëren van zeer mild of zelfs asymptomatisch tot ernstig. Op basis van de ernst van de infectie, verspreidingswijze via knutten (*Culicoides sp*) en mogelijkheden tot controle adviseert de COGEM AHSV, EHDV en EEV te classificeren als klasse 3 dierpathogenen. Op basis van genetische homologie kan TOV eveneens worden ingedeeld in het *Orbivirus* genus en adviseert de COGEM ook dit virus op klasse 3 in te schalen. De COGEM is van mening dat op dit moment onvoldoende gegevens bekend zijn om het Alpacavirus te classificeren.

De COGEM kan instemmen met het uitvoeren van de *in vitro* werkzaamheden met deze virussen en gg-varianten daarvan op de voorgestelde inperkingsniveaus in de HCU unit van het CVI. De COGEM acht het niet noodzakelijk de beoogde insectencellijnen te controleren op aanwezigheid van Orbivirussen, omdat BTV infecties niet bekend zijn bij nachtvlinders en een infectie bovendien vrijwel direct zichtbaar is door cellysis.

De COGEM adviseert de productie van gg-Orbivirussen in animale cellen en de infectie van animale cellen met gg-Orbivirussen in te schalen op ML-III niveau met als aanvullende maatregel. om open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet van tenminste klasse 2. Voor de *in vivo* werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze kunnen worden uitgevoerd op DM III niveau met als aanvullend voorschrift dat maatregelen worden getroffen om de aanwezigheid van knutten in de HCU unit te voorkomen.

Op genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c.

Drs. H.P. de Wijs

Dr. I. van der Leij

Classificatie en inschaling werkzaamheden met recombinante Orbivirussen

COGEM advies CGM/100712-05

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van een aantal virussen uit het genus *Orbivirus* en de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) Orbivirussen. De aanvrager, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, heeft al een vergunning voor werkzaamheden met diverse Blauwtongvirussen (BTV), eveneens uit het genus *Orbivirus* en vraagt een nieuwe vergunning aan om ook met andere virussen uit dit genus te werken. Het betreft het *Afrikaanse paardenpestvirus* (AHSV), *Enzootische haemorrhagische ziekte virus* (AHDV), *Equine encephalose virus* (EEV) en twee nog niet officieel bij het *Orbivirus* ingedeelde serogroepen, namelijk het *Toggenburgvirus* (TOV) en het een *Orbivirus*-isolaat uit Alpaca's (hierna *Alpacavirus* genoemd). De aanvrager wil een reverse genetics methode ontwikkelen om deze Orbivirussen verder te kunnen karakteriseren en later te gebruiken voor vaccinonderzoek.

De aanvrager beoogt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-III en DM-III in de zogenaamde High Containment Unit (HCU) van het CVI te Lelystad. Mede omdat de inrichting van de ML-III ruimte enigszins afwijkt van de inrichtingsvoorschriften zoals beschreven in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling GGO), is de COGEM om advies gevraagd.

1. Orbivirussen

Het genus *Orbivirus* is lid van de familie van de *Reoviridae* en bevat negentien soorten virussen en minstens honderddertig verschillende serotypen. Orbivirussen zijn dubbelstrengs RNA virussen die opgedeeld zijn in tien gensegmenten van verschillende lengtes. Orbivirussen besmetten voornamelijk vasculaire endotheelcellen en veroorzaken daar infecties. Het *Blue tongue virus* (BTV) is een van de bekendste Orbivirussen. De verschillende soorten Orbivirussen hebben een verschillende gastheerspecificiteit maar veroorzaken voornamelijk ziekte bij herkauwers. Orbivirussen zijn vector gedragen ziekteverwekkers die worden overgebracht tussen gewervelde gastheren door vectoren als knutten (*Culicoides sp.*).

1.1 Afrikaanse paardenpestvirus (AHSV)

Het *Afrikaanse paardenpestvirus* (*African horse sickness virus*; AHSV) behoort tot de Orbivirussen en veroorzaakt de ziekte Afrikaanse paardenpest onder paardachtigen.¹ Hoewel zebra's en ezels slechts zelden klinische symptomen vertonen, is de ziekte met een mortaliteit tot 95% bij paarden ernstig te noemen.¹ Klinische symptomen kunnen zich uiten in koorts, vochtophoping, bloedingen en hart- en longproblemen. Een geïnfecteerd dier kan binnen enkele dagen sterven, zelfs voordat symptomen opgemerkt worden.¹

Zebra's worden gezien als de natuurlijke gastheer en men vermoedt dat ze belangrijk zijn voor de persistentie van het virus in Afrika. Daarnaast blijkt dat ook honden onder laboratoriumomstandigheden geïnfecteerd kunnen raken met het virus. Bovendien kunnen honden geïnfecteerd raken door het eten van besmet paardenvlees.¹

AHSV is endemisch in tropische en subtropische gebieden van Afrika. In de jaren tachtig hebben enkele uitbraken van het virus plaatsgevonden in Spanje en Portugal. De eerste uitbraak werd veroorzaakt door geïmporteerde zieke zebra's uit Afrika, waarna het virus enkele jaren overwinterde en zo voor hernieuwde uitbraken zorgde. Persistentie van het virus was destijds mogelijk in de zuidelijke regio's, omdat de vector (*Culicoides sp.*) verantwoordelijk voor overdracht, de hele winter actief bleven vanwege de milde klimaatomstandigheden.¹ De belangrijkste vector van AHSV is *Culicoides imicola*, welke niet voorkomt in West- en Noord-Europa. Daarnaast bestaan er sterke vermoedens dat onder andere *C. obsoletus* AHSV kan overdragen.² Deze vector is verantwoordelijk gebleken voor de overdracht van het *Bluetongue virus* en daarmee voor de uitbraak van de ziekte blauwtong onder schapen in 2006 in Nederland, België en Duitsland.

Nederland beschikt over een rampenplan dat in werking treedt ingeval van een uitbraak van AHSV.³ Hierin staat onder meer beschreven dat dieren aanwezig op de plaats van de uitbraak worden geruimd en dat dieren binnen een omtrek van 20 km van de uitbraak worden gevaccineerd. Daarnaast kan ook een vervoersverbod ingesteld worden.³

1.2 Enzoötische haemorhagische ziekte virus (EHDV)

Enzoötische haemorhagische ziekte virus (EHDV) behoort tot het genus *Orbivirus* en is nauw verwant aan het *Blauwtongvirus* (BTV) en het *Afrikaanse paardenpestvirus* (EHDV). EHDV werd voor het eerst beschreven in Noord Amerika in 1955 naar aanleiding van massale sterfte onder witstaartherten.⁴

Infecties met EHDV zijn beschreven in verschillende soorten (zowel wilde als gedomesticeerde) herkauwers, waaronder schapen, runderen, verschillende soorten Aziatische en Noord Amerikaanse herten, elanden, en zwarte en witte Afrikaanse neushoorns.⁴ Naast witstaartherten zijn ook een aantal andere hertensoorten en runderen gevoelig voor EHDV. In 1959 werd bij runderen het *Ibaraki disease virus*, geclassificeerd als serotype 7 van EHDV, voor het eerst ontdekt in Japan.⁵ Infectie bij andere herkauwersoorten verloopt vaak asymptomatisch, waarna deze dieren langdurig immuniteit tegen de ziekte hebben opgebouwd.⁴ Serologisch onderzoek bij gedomesticeerde herkauwers in endemische gebieden wijst uit dat veel gedomesticeerde dieren een (subklinische) EHDV infectie hebben doorgemaakt.

Infecties bij herkauwers zijn niet besmettelijk voor mens en dier, het EHDV wordt verspreid tussen ontvankelijke herkauwers door knutten (*Culicoides sp.*) die als biologische vector fungeren. Infecties komen in gematigde klimaten het meest voor in de zomer en herfst wanneer vector populaties op hun top zijn. In tropische regionen zijn infecties met EHDV het hele jaar door te zien.⁴

EHDV veroorzaakt infecties in de cellen van bloedvaten waardoor bloedingen, trombose en necrose ontstaan.⁴ Acute EHD in herten wordt gekenmerkt door koorts, algehele zwakte,

excessieve speekselafscheiding, gezichtsoedeem, bloedophopingen in het slijmvlies van de binnenste oogleden en de mondholttes, ontstekingen aan de hoeven (kroonrandontsteking) en in de mondholte. Bij ernstige gevallen kunnen ernstige zweren in de mondholte en op de tong ontstaan waarbij necrose kan optreden. Daarnaast kunnen bloedingen optreden die zich manifesteren via de ontlasting.⁴

Tegen EHDV bestaat geen vaccin. Controle van de ziekte geschiedt voornamelijk door het minimaliseren van het risico van infectie door gebruik van insecticiden, insectenwerende middelen en watermanagement.⁴

Vanwege EHD uitbraken in het Middellandse zee gebied bij runderen (2006, 2007) en de blauwtong uitbraak in Noordwest Europa (2006-2008) wordt EHD als één van de opkomende dierziekten gezien.⁶ EHD is net als Blauwtong een potentieel risico voor herkauwers in Noordwest Europa. Er zijn geen aanwijzingen dat EHDV in Noord-Europa voorkomt, maar data hierover ontbreken veelal. Eind 2009 is het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) een project gestart om inzicht te krijgen in het voorkomen van EDH bij reeën in Nederland.⁷

1.3 Equine encephalose virus (EEV)

Equine encephalose virus (EEV) veroorzaakt in de meeste gevallen een milde vaak subklinische Orbivirus infectie bij paardachtigen. EEV werd voor het eerst aangetoond in 1976 in Zuid Afrika bij een 13-jarige merrie. Inmiddels zijn zeven serotypes van EEV bekend waarvan serotype 1 het meest voorkomt.⁸ EEV komt voor bij alle paardachtigen, maar lijkt alleen in paarden daadwerkelijk klinische symptomen te veroorzaken. Uit onderzoek blijkt dat met name ezels en in mindere mate zebra's bestand kunnen zijn tegen klinische symptomen terwijl uit aanwezigheid van antistoffen blijkt dat zij wel een infectie met EEV doorlopen hebben.⁸

Symptomen van EEV worden vermoedelijk veroorzaakt door schade aan bloedvaten, net als bij andere Orbivirussen. In negentig procent van de gevallen zijn geen of slechts milde symptomen herkenbaar bij een infectie met EEV, zoals temperatuursverhoging, moeheid en lusteloosheid.⁸ Infecties verlopen meestal subklinisch en EEV kent een lage mortaliteit. Er zijn slechts enkele fatale EEV infecties bekend.⁹ Hoewel er een aantal gevallen beschreven zijn waarbij EEV werd geïsoleerd uit paarden met een aangetast zenuwstelsel, acuut hartfalen en optreden van abortus, is een direct verband tussen EEV en deze symptomen niet experimenteel bevestigd.⁸

EEV wordt overgebracht door vectoren zoals knutten (*Culicoides sp.*). De verspreiding van EEV komt daarmee sterk overeen met die van het *Afrikaanse paardenpestvirus* en andere Orbivirussen, hoewel de symptomen in vergelijking met AHS zeer mild zijn.⁸ Er bestaat geen vaccin of behandelingsmethode voor EEV. In endemische gebieden probeert men infecties te voorkomen door insectenwerende maatregelen.⁸

1.4 Toggenburgvirus (TOV)

Het Toggenburgvirus (TOV) werd in 2008 gedetecteerd bij een BTV screening van gezonde geiten in Zwitserland.¹⁰ Gebaseerd op de virusopbouw en nucleotidensequentie wordt TOV ook wel beschouwd als een 25^{ste} serotype van BTV. Sinds de eerste detectie in Zwitserland, is TOV ook aangetoond in Zuid Duitsland en Noord-Italië.¹⁰

Andere herkauwers (runderen, alpaca's) bij hetzelfde bedrijf als waar TOV werd gevonden, testen negatief voor TOV. Experimentele inoculatie met TOV wijst uit dat dit virus naast geiten ook schapen kan infecteren. Bij schapen werden milde BTV verschijnselen geconstateerd. Bij geiten werden geen blauwtong specifieke symptomen of andere tekenen van ziekte waargenomen.¹⁰ Er zijn aanwijzingen dat nakomelingen van TOV geïnfecteerde geiten wel effecten ondervinden van het virus, maar direct wetenschappelijk bewijs hiervoor ontbreekt. In contrast tot andere BTV serotypes, kan TOV zich niet vermenigvuldigen buiten de natuurlijke dierlijke gastheer zoals in celcultures of bevruchte kippen eieren.¹⁰

1.5 Alpacavirus

Het Alpacavirus is recentelijk geïsoleerd uit Alpaca's. Over dit virus is nog niet gepubliceerd in de wetenschappelijke literatuur.

2. Classificatie

De Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (Regeling GGO) voorziet in maatregelen om mens en milieu te beschermen bij de vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde organismen. Virussen zijn op basis van hun pathogeniteit ingedeeld in vier klassen. Deze indeling is gebaseerd op criteria voor humane pathogenen. In het geval van dierpathogene virussen zijn deze criteria niet toereikend, omdat dierpathogenen in de meeste gevallen geen bedreiging vormen voor de mens.

In 2006 heeft de COGEM een aantal speciale criteria geformuleerd met betrekking tot dierpathogenen. De COGEM heeft geadviseerd ggo-activiteiten met dierpathogene virussen in te delen in vier pathogeniteitsklassen, waarbij criteria worden gehanteerd die betrekking hebben op het dierpathogene karakter en de milieurisico's, zoals verspreidingsroute, de overleving van het pathogeen in het milieu, de mate van besmettelijkheid en de mortaliteit.¹¹ Bij elke pathogeniteitsklasse heeft de COGEM inperkende maatregelen aangegeven die essentieel zijn om verspreiding naar het milieu tegen te gaan. Deze inrichtingsvoorschriften kunnen afwijken van de voorschriften voor werkzaamheden met humaan pathogeen, aangezien dierpathogene virussen in de meeste gevallen geen ziekte kunnen veroorzaken in mensen en bescherming van de laboratoriummedewerker niet aan de orde is. De COGEM onderscheidt de volgende vier pathogeniteitsklassen voor dierpathogene virussen op basis van de aangegeven criteria:

Dierpathogeen virus van klasse 1: Het virus of de virusstam wordt gebruikt als vaccinatiemiddel, of is niet pathogeen en leidt niet tot een ziektebeeld.

Dierpathogeen virus van klasse 2: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is over het algemeen in het milieu aanwezig (enzoïtisch), waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu gering zijn;
- Vectoren spelen geen rol in de transmissie;

- Op populatieniveau is er beperkte transmissie door direct contact;
- Er treedt geen aërogene transmissie van belang op;
- Het virus persisteert niet buiten de gastheer;
- De mortaliteit is veelal gering;
- Een effectief vaccin is beschikbaar en wordt in de praktijk toegepast.

Dierpathogeen virus van klasse 3: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren een ernstige ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is niet enzoötisch aanwezig, waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn;
- Vectortransmissie is mogelijk;
- Op populatieniveau is er relatief gemakkelijke transmissie door direct contact;
- Aërogene transmissie kan voorkomen;
- Indirecte transmissie is mogelijk via bijvoorbeeld personen, transportmiddelen, afval en dierlijke producten;
- Het virus kan buiten de gastheer persisteren;
- De mortaliteit kan hoog zijn;
- Er is geen effectief vaccin beschikbaar of preventieve vaccinatie vindt in de praktijk niet plaats.

Dierpathogeen virus van klasse 4: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren een zeer ernstige ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is niet enzoötisch aanwezig waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu zeer ernstig zijn;
- Vectortransmissie is mogelijk;
- Op populatieniveau is er zeer gemakkelijk transmissie door direct contact;
- Aërogene transmissie kan bij sommige virussen een grote rol spelen;
- Als gevolg van het gastheerbereik van het virus kan er gemakkelijk transmissie tussen soorten optreden;
- Indirecte transmissie via personen, transportmiddelen, afvallen en dierlijke producten speelt een belangrijke rol;
- Het virus kan buiten de gastheer makkelijk persisteren;
- De mortaliteit kan hoog zijn;
- Er is geen effectief vaccin beschikbaar of preventieve vaccinatie vindt in de praktijk niet plaats.

In andere landen in Europa bestaan eveneens criteria voor de indeling van pathogene organismen op basis waarvan lijsten zijn aangelegd met betrekking tot de inschaling van deze organismen. De Belgian Biosafety Server heeft EHDV ingedeeld als een pathogeen van klasse 3 en EEV in pathogeniteitsklasse 2.¹² TOV en het Alpacavirus zijn nog niet in deze lijsten opgenomen. Dit

geldt ook voor de lijst van de Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS).¹³ In deze lijst is alleen EHDV opgenomen en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 voor dierpathogenen.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager heeft al een vergunning voor het ontwikkelen van vaccins op basis van enkele BTV stammen (onder andere BTV-8) en is voornemens hier een 'reverse genetics systeem' voor te ontwikkelen. Daarna wil de aanvrager eveneens een dergelijk systeem ontwikkelen voor AHSV, EHDV, EEV, TOV en het Alpacavirus. De werkzaamheden onder deze aanvraag betreffen het kloneren van combinaties van genen van de genoemde Orbivirussen, het genereren van chimere en/of gemuteerde Orbivirussen en tot expressie brengen van deze virussen in animale en insectencellijnen. De aanvrager heeft aangegeven de volgende gg-Orbivirussen te willen vervaardigen:

- mutante Orbivirussen met chimere (uitwisseling van functionele domeinen van genen) en/of mutante (uitschakeling) genoomsegmenten waarbij de onderdelen van de segmenten van andere Orbivirussen afkomstig zijn.
- zgn. synthetische reassortanten (SRs) tussen virussen behorend tot dezelfde serogroep (reassortment: uitwisseling van genoomsegmenten)
- zgn. synthetische reassortanten (SRs) tussen virussen behorend tot verschillende serogroepen (chimere SRs)

De mutante/chimere en gereassorteerde Orbivirussen worden gegenereerd om de effecten in/op de geïnfecteerde cel en daarna ook in het dier te kunnen bestuderen en te bepalen welke orbivirale eiwitten of onderdelen daarvan verantwoordelijk zijn voor gastheertropisme, virulentie en vermogen tot reassortment.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2006 en 2007 geadviseerd over de classificatie van twee andere Orbivirussen: het *Blue tongue virus (BTV)* en het *Afrikaanse paardenpestvirus(AHSV)*.^{14,15} BTV was in eerste instantie ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De afwezigheid van een vector verantwoordelijk voor verspreiding van het virus in Nederland vormde de basis van deze inschaling. Uit onderzoek bleek echter dat *C. obsoletus* als geschikte vector ook in Nederland aanwezig is. Hierdoor kan het virus zich in principe in Nederland verspreiden. De COGEM adviseerde daarom in 2006 om BTV in de hogere pathogeniteitsklasse 3 in te delen. De aanwezigheid van een vector die het virus kan verspreiden in combinatie met een ziekte die gekenmerkt wordt door een hoge mortaliteit, was ook reden om de inschaling van AHSV te herzien. AHSV is eveneens ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3.

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over EHDV, EEV, TOV en het Alpacavirus.

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd de adviseren over de inschaling van enkele Orbivirussen en de inschaling van werkzaamheden met gg-Orbivirussen. Het betreft zowel laboratoriumhandelingen als werkzaamheden in associatie met dieren. Alvorens tot een advies te komen over de inschaling van de werkzaamheden met EHDV, EEV, TOV en Alpacavirus, wordt ingegaan op de classificatie van deze virussen en de inperking daarvan tijdens de werkzaamheden.

5.1 Classificatie van Orbivirussen

Dierpathogene virussen worden op basis van het dierpathogene karakter en de milieurisico's ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen voor GGO-activiteiten. Bij AHSV, EHDV, EEV en TOV zijn geen gevallen bekend waarbij mensen geïnfecteerd zijn. Derhalve worden deze Orbivirussen geclassificeerd als dierpathogenen en niet als (potentiële) zoönotische diervirussen. Over het Alpacavirus zijn geen gegevens bekend.

AHSV is in 2007 door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁵ De COGEM ziet geen redenen om dit advies ter herzien.

De COGEM is van mening dat de eigenschappen van EHDV en EEV overeen komen met criteria van een klasse 3 pathogeen. Beide virussen hebben een serieus ziektepotentieel en de mortaliteit kan in bepaalde gastheren hoog zijn. Alle aangevraagde Orbivirussen worden door *Culicoides* species overgebracht en kunnen in meer of mindere mate persisteren in een vectorreservoir. Ook kunnen zij onderling recombineren binnen de verschillende serotypes. Het ontbreken van een vaccin voor deze virussen is eveneens een belangrijke factor. Van EHDV en EEV acht de COGEM het voldoende aannemelijk gemaakt dat zij niet enzoëtisch aanwezig zijn in Nederland.

De aanvrager wil daarnaast ook werken met twee relatief nieuwe Orbivirussen die nog niet officieel zijn ingedeeld in dit genus. De aanvrager geeft aan dat het Toggenburgvirus (TOV) op basis van de mate van genetische homologie officieus is ingedeeld in het Orbivirus genus. Gebaseerd op de virusopbouw en nucleotidensequentie wordt TOV ook wel beschouwd als een 25^{ste} serotype van het blauwtongvirus (BTV).¹⁰ Over het enzoëtisch potentieel van TOV is nog niets bekend. De COGEM adviseert TOV in te schalen in pathogeniteitsklasse 3.

Over het Alpacavirus is zeer weinig bekend behalve dat dit volgens de aanvrager onder het Orbivirus genus valt. Gegevens hierover ontbreken echter. De COGEM is van mening dat op dit moment onvoldoende gegevens bekend zijn om het Alpaca virus te kunnen classificeren.

5.2 Inperking van beoogde Orbivirussen.

Om werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo) uit te mogen voeren, moeten laboratoriumruimtes en dierverblijven aan verschillende inrichtings- en werkvoorschriften voldoen. Dit betekent onder meer het nemen van maatregelen gericht tegen ontsnapping van het ggo vanuit het laboratorium naar het milieu. Dergelijke maatregelen betreffen onder andere het werken met onderdruk en HEPA filters in de ontluchtingskanalen. Welke maatregelen gehanteerd moeten worden, is afhankelijk van de aard van het organisme.

In de Regeling ggo worden organismen op basis van hun pathogeniteit ingedeeld in klasse 1 (niet-pathogeen) tot klasse 4 (zeer pathogeen).¹⁶ Aan elke klasse is een bepaald niveau van inperking en werkvoorschriften gekoppeld. Grofweg betekent dit dat ggo-werkzaamheden met een klasse 1 organisme kunnen plaatsvinden in een ML-I laboratorium terwijl werkzaamheden met een klasse 4 pathogeen in een ML-IV ruimte moeten plaatsvinden. Deze gehele systematiek is ontwikkeld voor pathogenen van de mens. Zowel de indelingscriteria als de inrichtings- en werkvoorschriften zijn gericht op de bescherming van de mens.

Laboratoriumwerkzaamheden met klasse 3 organismen dienen minimaal plaats te vinden op ML-III niveau. De inrichting van de ML-III ruimte binnen de HCU van de aanvrager verschilt op enkele punten van de inrichtings- en werkvoorschriften zoals beschreven in de Regeling GGO. Volgens deze Regeling zou bijvoorbeeld de werkruimte voorzien moeten zijn van een afsluitbare toegangssluis voorzien van twee deuren. De HCU beschikt echter over een toegangssluis op de grens tussen het gehele onderdrukgebied van de HCU (binnen dit gebied liggen meerdere laboratoria en werkruimtes) en de buitenwereld. Zodoende kunnen de in de HCU beroepsmatig aanwezige personen blootgesteld worden aan micro-organismen waarmee gewerkt wordt.

Dit in tegenstelling tot werkzaamheden in een ML-III ruimte waarbinnen alleen de werkruimte valt en medewerkers in aangrenzende ruimtes beschermd worden tegen het pathogeen door de inperkingsmaatregelen van de ML-III ruimte. In de HCU wordt echter alleen gewerkt met dierpathogenen. Dit maakt dat de noodzaak van extra bescherming van de laboratoriummedewerker niet aan de orde is. Gezien de aanwezigheid van onderdruk in de werkruimtes, de toegangssluis bij de ingang van de HCU en de overige inrichtings- en werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat de HCU voldoende bescherming biedt om directe verspreiding van dierpathogenen in het milieu buiten de HCU te voorkomen.

De aanvrager is eveneens voornemens om dierexperimenteel onderzoek te verrichten op DM-III niveau. Deze werkruimte voldoet geheel aan de inrichtings- en werkvoorschriften zoals gesteld in de Regeling GGO. De COGEM is van mening dat werkzaamheden met dierpathogenen van pathogeniteitsklasse 3 onder deze condities uitgevoerd kunnen worden. Bovendien worden de dieren na afloop van het onderzoek geëuthanaseerd en afgevoerd ter destructie, waarna het afval geautoclaveerd wordt. Dit alles vindt plaats binnen de HCU.

5.3 Inschaling van werkzaamheden met gg-Orbivirussen

Op basis van wetenschappelijke literatuur en onderzoek kan geconcludeerd worden dat tot nog toe bekende Orbivirussen niet besmettelijk zijn voor mens en dier en op natuurlijke wijze enkel kunnen worden overgedragen door beten van *Culicoide* species zoals knutten. Orbivirussen repliceren in specifieke dier- en knutsoorten. BTV en EHDV repliceren uitsluitend in herkauwers en AHSV en EEV enkel in paardachtigen. Hoewel Orbivirussen worden verspreid door knutsoorten die bij verschillende diersoorten (inclusief de mens) hun bloedmaal halen, zijn infecties enkel aangetoond bij herkauwers en / of paardachtigen. De COGEM is van mening dat

voldoende aannemelijk is gemaakt dat AHSV, EHDV, EEV en TOV een verwaarloosbaar klein risico vormen voor de mens.

5.3.1 In vitro werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om delen en combinaties van genen van de aanvraagde Orbivirussen te kloneren in *E.coli*. Hierbij wordt geen volledig virusgenoom gekloneerd, maar maximaal negen van de tien gensegmenten. Orbivirussen vertonen in grote mate homologie in genopbouw en gensegmenten. BTV is één van de meest gekarakteriseerde Orbivirussen waarvan bekend is dat het ontbreken van één gensegment altijd tot een defect virus zal leiden. Dit is eveneens een bekend verschijnsel bij andere *Reoviridae*. Gezien de grote mate van homologie tussen overeenkomstige genoomsegmenten en de overeenkomsten in virusopbouw en enzymatische orbivirale eiwitten acht de COGEM het aannemelijk dat ook bij andere Orbivirussen een incompleet genoom (minder dan tien complete gensegmenten) zal leiden tot een defect virus. De COGEM is van mening dat voldoende aannemelijk is gemaakt dat alle tien genoomsegmenten essentieel zijn voor een functionerend Orbivirus. Indien geen volledig virusgenoom wordt gekloneerd, zal deze vector enkel informatie bevatten voor een defect virus. Derhalve is de COGEM van mening dat de voorgenomen kloneringswerkzaamheden met delen en combinaties van genen van Orbivirussen uitgevoerd kunnen worden op ML-I niveau.

De aanvrager beoogt defecte Orbivirus genomen tot expressie te brengen met behulp van *Baculovirus* in insectencellen. Het betreft insectencellijnen van de nachtvlindersoort *Spodoptera frugiperda*. In wetenschappelijke literatuur heeft de COGEM geen gegevens gevonden over het voorkomen van BTV verwante Orbivirussen bij nachtvlinders. Bovendien geven Orbivirussen doorgaans een lytische infectie waarbij de cellen afsterven. In het theoretische geval dat *Spodoptera* insectencellijnen een Orbivirus zouden bevatten, zal dit vrijwel onmiddellijk zichtbaar zijn door optreden van cellysis. De COGEM acht het daarom onwaarschijnlijk dat de betreffende cellijnen complementerende Orbivirussen of sequenties zullen bevatten en is van mening dat het niet noodzakelijk is om deze cellijnen te testen op aanwezigheid van (complementerende sequenties van) Orbivirussen. Derhalve adviseert de COGEM de werkzaamheden waarbij defecte Orbivirus genomen tot expressie worden gebracht uit te voeren op ML-II niveau zonder aanvullend voorschrift.

Uiteindelijk is de aanvrager voornemens om genetisch gemodificeerde Orbivirussen te vervaardigen door middel van transfectie. Vervolgens zullen de geproduceerde gg-Orbivirussen gebruikt worden voor infectie van animale cellen.

De aanvrager beredeneert dat de aangevraagde Orbivirussen geen zoönotisch potentieel hebben mede doordat de vectoren (*Colicoides species*) die het virus verspreiden bij verschillende diersoorten hun bloedmaal halen maar enkel bij herkauwers en paardachtigen infecties veroorzaken. Deze veldsituatie wijst volgens de aanvrager uit dat verspreiding van Orbivirus naar andere diersoorten, inclusief de mens, uitgesloten is.

Gezien de breedte van de aangevraagde vergunning en het ontbreken van informatie over twee recent aangetroffen Orbivirussen (TOV en Alpaca virus) acht de COGEM het onvoldoende onderbouwd dat het ontstaan van een gg-Orbivirus dat andere animale (waaronder humane) cellen kan infecteren, uitgesloten is. Bij de productie van gg-Orbivirus is de aanvrager voornemens ook apencellen (VERO cellen) te gebruiken. Gezien de breedte van de aanvraag waarbij recombinanten worden gemaakt van verschillende Orbivirussen, kan volgens de COGEM niet worden uitgesloten dat een mutant Orbivirus kan ontstaan dat replicatiecompetent is in apencellen. De COGEM acht vervolgens de stap naar een replicatiecompetent gg-Orbivirus dat humane cellen kan infecteren, relatief klein.

Er zijn echter geen directe transmissieroutes bij Orbivirussen bekend. Transmissie van Orbivirussen vindt ofwel plaats via een vector (knutten) of iatrogeen (bloed-bloed contact, n.a.v. werken met dezelfde naald, bloedtransfusie of prik accident). In de HCU worden maatregelen genomen om de aanwezigheid van biologische vectoren (knutten en andere insecten) te voorkomen. De kans dat een gg-Orbivirus ontstaat dat humane cellen kan infecteren is niet volledig uitgesloten maar wel nagenoeg verwaarloosbaar klein. De kans dat dit gg-Orbivirus vervolgens via een vector een medewerker infecteert wordt door de COGEM verwaarloosbaar klein geacht. De COGEM wijst daarbij wel op het belang van maatregelen om knutten in de HCU te voorkomen en adviseert een aanvullend voorschrift in acht te nemen.

De COGEM adviseert deze experimenten in te schalen op ML-III niveau met als aanvullend voorschrift open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet van ten minste klasse 2. Dit geldt eveneens voor handelingen met cellen en weefsels van dieren die geïnfecteerd worden met gg-Orbivirussen en daarna worden gechallengeerd met wildtype veldisolaten.

5.3.2 In vivo werkzaamheden

De *in vivo* werkzaamheden onder deze aanvraag betreffen handelingen met dieren in associatie met vervaardigde gg- Orbivirussen en challenge experimenten met wildtype BTV, EHDV, AHSV en EEV. Alle tot nog toe bekende Orbivirussen hebben geen zoönotisch potentieel en zijn voor transmissie afhankelijk van een biologische vector. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat er bij de voorgenomen experimenten gg-Orbivirussen ontstaan die een directe transmissieroute kennen en tevens een veranderd gastheertropisme hebben. Het nemen van voorzorgsmaatregelen om de aanwezigheid van insecten in de HCU te voorkomen, is daarom volgens de COGEM voldoende om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

Onder voorwaarde dat voorzorgsmaatregelen getroffen worden om de entree van knutten in de HCU via de proefdieren of personeel te voorkomen, kan de COGEM instemmen met het uitvoeren van de *in vivo* werkzaamheden op DM-III niveau.

6. Conclusie

Op basis van de overwegingen in dit advies adviseert de COGEM AHSV, EHDV, EEV, en TOV in te schalen in pathogeniteitsklasse 3. De COGEM is van mening dat op dit moment onvoldoende gegevens bekend zijn om het Alpaca virus te classificeren.

De COGEM kan instemmen met het uitvoeren van de *in vitro* werkzaamheden met de eerstgenoemde vier virussen en gg-varianten daarvan op de voorgestelde inperkingsniveaus in de HCU unit van het CVI. Omdat geen gegevens bekend zijn over het voorkomen van BTV verwante Orbivirussen bij nachtvlinders en een theoretische infectie vrijwel direct zichtbaar is door cellysis, acht de COGEM het niet noodzakelijk de beoogde insectencellijnen te controleren op aanwezigheid van Orbivirussen.

De COGEM adviseert de productie van gg-Orbivirussen in animale cellen en de infectie van animale cellen met gg-Orbivirussen in te schalen op ML-III niveau met als aanvullende maatregel om open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet van tenminste klasse 2. Voor de *in vivo* werkzaamheden is de COGEM van mening dat deze kunnen worden uitgevoerd op DM III niveau met als aanvullend voorschrift dat maatregelen worden getroffen die de aanwezigheid van knutten in de HCU unit voorkomen.

De COGEM is van mening dat wanneer bovengenoemde inschaling en aanvullende maatregelen in acht worden genomen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

- ¹ Mellor, P.S., Hamblin, C. (2004). African horse sickness. *Vet. Res.* 35: 445-466
- ² COGEM (2006). Classificatie van *Bluetongue virus* (CGM/061024-03)
- ³ Ministerie LNV (2002). African horse sickness contingency plan for the Netherlands
- ⁴ NJ MacLachlan and BI Osburn (2005) Epizootic haemorrhagic disease of deer.. Uit: infectious diseases of Livestock, 2nd edition JAW Croetzler and RC Tustin
- ⁵ Kitano Y (2005). Ibaraki Disease in cattle. Uit: infectious diseases of Livestock, 2nd edition JAW Croetzler and RC Tustin
- ⁶ Temizel EM et al (2009). Epizootic Hemorrhagic Disease in Cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 2, February 2009
- ⁷ DWHC (2009). Nationale surveillance van infecties en ziekten in reeën (internet: <http://www.dwhc.nl/images/project1/Uitleg.pdf> (laatst bezocht 12 juli 2010))
- ⁸ AJ Guthrie and JAW Coetzer (2005). Equine Encephalosis. PG Howell,. Uit: infectious diseases of Livestock, 2nd edition JAW Croetzler and RC Tustin
- ⁹ MacLachlan NJ, Guthrie AJ (2010) Re-emergence of bluetongue, African horse sickness and other Orbivirus diseases. *Vet. Res.*
- ¹⁰ MA Hoffmann *et al* (2010) Detection of Toggenburg Orbivirus by a segment 2-specific quantitative RT-PCR. *Journal of Virological Methods.*
- ¹¹ COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
- ¹² Belgian Biosafety Server (http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (laatst bezocht 12 juli 2010))
- ¹³ Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2009). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten.
- ¹⁴ COGEM (2008). Advies inschaling van werkzaamheden met het Blauwtongvirus (CGM/ 081126-01)
- ¹⁵ COGEM (2007). Advies classificatie *Afrikaanse paardenpestvirus* (CGM/070424-01)
- ¹⁶ Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004