

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 15 oktober 2020
KENMERK CGM/201015-01
ONDERWERP Advies omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd
Rift Valley fever phlebovirus deletiemutanten

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-203_2.8-000 getiteld 'Werkzaamheden met Rift Valley fever virus NSs deletiemutanten', ingediend door Wageningen Bioveterinary Research, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met verschillende genetisch gemodificeerde (gg-) *Rift Valley fever phlebovirus* (RVFV) deletiemutanten. RVFV kan ziekte veroorzaken bij herkauwers en de mens. Schapen, en in het bijzonder lammeren, zijn het meest vatbaar voor het virus en infectie leidt bij deze dieren tot een hoge mortaliteit. Infectie van drachtige schapen leidt vrijwel altijd tot abortus. Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen, hoewel bij een klein deel van de patiënten ernstigere verschijnselen kunnen ontstaan. De COGEM heeft wildtype RVFV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

De aanvrager is voornemens gg-varianten van RVFV te produceren waarin het gen coderend voor de virulentiefactor NSs geheel of gedeeltelijk ontbreekt. NSs speelt onder meer een rol bij het onderdrukken van het immuunsysteem van de gastheer na infectie. De COGEM is van oordeel dat de gg-RVFV varianten waarmee de aanvrager voornemens is te gaan werken, verzwakt zijn ten opzichte van wildtype RVFV door de aanwezige (partiële) NSs deletie.

Concluderend adviseert COGEM de voorgenomen werkzaamheden omlaag te schalen van ML-III naar ML-II en stemt in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden prof. dr. J. Kortekaas en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde Rift Valley fever phlebovirus (RVFV) NSs deletiemutanten

COGEM advies CGM/201015-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met verschillende genetisch gemodificeerde (gg-) deletiemutanten die gebaseerd zijn op *Rift Valley fever phlebovirus* (RVFV). De aanvrager is voornemens gg-varianten van RVFV te produceren waarin het gen coderend voor de virulentiefactor NSs geheel of gedeeltelijk ontbreekt. De geproduceerde gg-RVFV virusdeeltjes zullen vervolgens gebruikt worden om animale en insectencellen te infecteren ten behoeve van fundamenteel onderzoek. De aanvrager is van oordeel dat de (partiële) NSs deletie de gg-RVFV mutanten dusdanig atteneren dat de werkzaamheden omlaaggeschaald kunnen worden van ML-III naar ML-II.

1.1 Rift Valley fever phlebovirus (RVFV)

Het *Rift Valley fever phlebovirus* (RVFV), voorheen genaamd Rift Valley fever virus, veroorzaakt ziekte bij herkauwers (schapen, geiten, koeien en kamelen) en de mens.¹ RVFV is een ‘arthropod borne virus’ (arbovirus). Verschillende *Aedes* en *Culex* muggensoorten kunnen als vector voor het virus fungeren.^{1,2,4} Schapen, en in het bijzonder lammeren, zijn het meest vatbaar voor het virus met een mortaliteit variërend van ongeveer 20-70% bij volwassen schapen tot 70-100% bij lammeren.² Infectie van drachtige schapen leidt vrijwel altijd tot abortus.² De ziekte veroorzaakt door RVFV staat vermeld op de lijst van meldingsplichtige dierziekten van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE).³

Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen, hoewel bij een klein deel van de patiënten ernstigere verschijnselen kunnen ontstaan, zoals hemorrhagische koorts (minder dan 1% van de patiënten) of encefalitis (hersenontsteking) (minder dan 1% van de patiënten).^{1,4} Mensen worden voornamelijk met RVFV besmet via (in)direct contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren.^{2,5} Tevens kunnen mensen geïnfecteerd raken door een beet van een geïnfecteerde mug of steekvlieg. Ook inhalatie van aërosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden kan leiden tot humane infecties.^{4,5} Mensen zijn zogenaamde ‘dead end hosts’ en transmissie van mens-op-mens is nog nooit gerapporteerd.^{4,5,6,23}

1.1.1 Genomische organisatie van RVFV

RVFV is een negatief-strengs RNA virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie *Phenuiviridae* (voorheen *Bunyaviridae*).⁷ Het genoom bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment.^{8,9} Het S-genoomsegment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de RNA genoomsegmenten het zogenaamde ‘nucleocapside’. Daarnaast codeert het S-genoomsegment voor het niet-structurele eiwit NSs dat onder andere betrokken is bij het onderdrukken van het immuunsysteem van de gastheer na infectie, door het remmen van virusgeïnduceerde interferon (IFN) productie. Dit eiwit is niet essentieel voor het virus, maar speelt een belangrijke rol bij de virulentie van het RVFV.^{10,11,12,13,14,15,16} Het M-genoomsegment codeert voor het

glycoproteïne voorloper eiwit GPC, dat na translatie gekleefd wordt in Gn en Gc, en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden.⁹ Deze interactie resulteert in de opname van het virus in de cel. Verder codeert het M-genoomsegment voor een structureel 78 kD glycoproteïne waarvan de functie niet duidelijk is. Dit glycoproteïne wordt ingebouwd in virusdeeltjes die geproduceerd worden door insectencellen (maar niet door Vero-cellen).¹⁷ Het L-genoomsegment codeert voor het RNA polymerase L, dat verantwoordelijk is voor virale RNA synthese.⁸ De eiwitten L en N zijn essentieel voor RVFV replicatie.⁸ Aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten van RVFV bevinden zich de zogenaamde 'untranslated regions' of UTR's. Per genoomsegment L, M en S verschillen deze UTR's in lengte en nucleotidevolgorde. De UTR's zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.^{8,23}

1.2 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens met 'reverse-genetics' verschillende replicatiecompetente gg-RVFV deletiemutanten (gg-Clone 13 en gg-RVFVdelNSs virussen) te produceren door drie plasmiden die coderen voor de verschillende genoomsegmenten (S, M en L) van RVFV in BSR-T7 cellen te transfecteren.

Voor de productie van gg-Clone 13 virus waarin 69% van het gen coderend voor de virulentiefactor NSs ontbreekt, wordt gebruik gemaakt van:

- pUC57-L: codeert voor de sequentie van het gehele L-genoomsegment van RVFV;
- pUC57-M: codeert voor de sequentie van het gehele M-genoomsegment van RVFV;
- pUC57-S-Clone 13: codeert voor de sequentie van het gehele S-genoomsegment van RVFV isolaat Clone 13¹² waarin 69% van het gen coderend voor de virulentiefactor NSs ontbreekt.

Voor de productie van de gg-RVFVdelNSs virussen waarin het gehele NSs gen is gedeleteerd of vervangen door een reporter gen, wordt gebruik gemaakt van:

- pUC57-L: codeert voor de sequentie van het gehele L-genoomsegment van RVFV;
- pUC57-M: codeert voor de sequentie van het gehele M-genoomsegment van RVFV;
- pUC57-S-eGFP (of verwant fluorescerend eiwit zoals red fluorescent protein): codeert voor de sequentie van het S-genoomsegment van RVFV waarin het NSs gen is vervangen door het gen coderend voor eGFP (of een verwant fluorescerend eiwit).

De geproduceerde gg-RVFV virusdeeltjes zullen gebruikt worden om animale en insectencellen te infecteren ten behoeve van fundamenteel onderzoek.

2. Eerdere COGEM adviezen

In een advies uit 2008 heeft de COGEM wildtype RVFV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁸ In dit advies heeft de COGEM geadviseerd om *in vitro* werkzaamheden met volvirulent gg-RVFV op ML-III inperkingsniveau en dierexperimenten op DM-III niveau in te schalen. Hierna heeft de COGEM nog

verscheidene keren geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-RVFP virussen.^{19,20,21,22,23}

In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met twee RVFP-4SΔNS varianten in associatie met muizen, schapen of runderen.²¹ In het genoom van deze RVFP deletiemutanten was het M segment gesplitst over twee aparte genoomsegmenten, waardoor de gg-virussen vier genoomsegmenten bevatten. Bij de ene deletiemutant (die gebaseerd was op het RVFP isolaat 35/74) was het gen coderend voor NSs geheel verwijderd, en bij de andere deletiemutant (die gebaseerd was op het Clone 13 virusisolaat) gedeeltelijk verwijderd. De COGEM oordeelde dat de RVFP-4S-ΔNS varianten geattenuëerd zijn ten opzichte van wildtype RVFP en adviseerde de voorgenomen werkzaamheden met deze gg-virussen omlaag te schalen naar ML-II en DM-II inperkingsniveau en daarbij enkele aanvullende voorschriften te hanteren.²¹

In 2016 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met gg-RVFP virussen in combinatie met muggen en schapen.²² De COGEM kon ermee instemmen dat de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III en DM-III werden uitgevoerd en was van oordeel dat onder inachtneming van enkele additionele voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein waren.²² De gg-virussen betroffen *in vitro* gegenereerde varianten van volvirulent gg-RVFP, en dezelfde twee deletiemutanten (RVFP-4S-ΔNS varianten) als waarover in het advies uit 2015 reeds was geadviseerd.

Eerder dit jaar heeft de COGEM nogmaals geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met een gg-RVFP kandidaatvaccin.²³ Hierbij werd gebruik gemaakt van dezelfde RVFP-4S-ΔNS variant waarover ook in 2015 en 2016 was geadviseerd, namelijk de variant die gebaseerd is op RVFP isolaat 35/74 waarin het gehele NSs gen is verwijderd. De aanvrager was voornemens schapen intramusculair te injecteren met het kandidaatvaccin onder DM-II inperking, en verzocht de gevaccineerde dieren vanaf één dag na vaccinatie op D-I (gesloten verblijf en/of openluchtverblijf) te mogen huisvesten. De COGEM oordeelde dat de risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden 24 uur na vaccinatie met RVFP-4S-ΔNS, van DM-II naar D-I inperkingsniveau verwaarloosbaar klein zijn. Tevens kon de COGEM instemmen met ontheffing voor het gebruik van een veiligheidskabinet klasse II bij de vaccinatiewerkzaamheden van schapen met gg-RVFP op DM-II, met in achtneming van een aantal aanvullende voorschriften.²³

3. Overweging en advies

Conform de indeling van RVFP in pathogeniteitsklasse 3 worden laboratoriumhandelingen met gg-RVFP over het algemeen op inperkingsniveau III ingeschaald. Echter voor geattenuëerde virussen kan een lagere inperking worden gehanteerd.

Eerder heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met RVFP-4S-ΔNS varianten die een gedeeltelijke (69%) of gehele deletie in het NSs gen én een 4-gesegmenteerd genoom bevatten (door opsplitsing van het M-segment).²¹ De COGEM concludeerde dat wetenschappelijke studies hebben uitgewezen dat de deletie van het gen coderend voor NSs de pathogeniteit van RVFP in verschillende diermodellen vermindert. Verder concludeerde zij op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens dat ook de opsplitsing van het virusgenoom over vier genoomsegmenten tot verzwakking van het virus leidt. Vanwege de combinatie van beide verzwakkende modificaties en de beperkte

verspreidingsmogelijkheden van RVFV in een laboratorium heeft de COGEM geadviseerd de werkzaamheden met deze gg-RVFV virussen in te schalen op inperkingsniveau II, onder inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.²¹

Het verschil tussen de RVFV-4S-ΔNS varianten uit de eerder adviezen en de onderhavige gg-Clone 13 en gg-RVFVdelNSs virussen is dat deze laatstgenoemde gg-virussen een 3-gesegmenteerd genoom (dus géén opsplitsing van het M segment) bezitten. Wél bevatten deze gg-virussen net als de hierboven genoemde RVFV-4S-ΔNS varianten waarover de COGEM reeds heeft geadviseerd, een gedeeltelijke of gehele deletie van het NSs gen.

De aanvrager is van mening dat de gg-Clone 13 en gg-RVFVdelNSs virussen vanwege het feit dat deze gg-virussen geen functioneel NSs gen bezitten, avirulent zijn voor dieren (m.u.v. drachtige schapen). Hij acht deze gg-virussen derhalve voldoende geattenuëerd ten opzichte van wildtype RVFV om een inschaling op ML-II niveau te rechtvaardigen.

Ter onderbouwing hiervoor verwijst hij naar verscheidene studies met het natuurlijke RVFV isolaat Clone 13. Clone 13 mist 69% van het gen dat codeert voor het niet-structurele eiwit NSs.¹² NSs onderdrukt het immuunsysteem van de gastheer door het remmen van virus-geïnduceerde IFN productie; de eerste verdedigingslijn tegen virale infecties.^{10,11,12,13}

De COGEM is van oordeel dat door het ontbreken van deze virulentiefactor Clone 13 geattenuëerd is. De veiligheid en effectiviteit van de toepassing van het levend verzwakte Clone 13 virus als vaccin is in verscheidene (veld)studies bij muizen, (drachtige) schapen, (drachtige) geiten en runderen onderzocht.^{12,15,24,25,26,27} Toediening van Clone 13 aan deze diersoorten wordt in het algemeen goed getolereerd.^{12,15,24,25,26,27} Subcutane of intradermale toediening van een overdosis van Clone 13 aan lammeren leidt niet tot uitscheiding en er vindt geen transmissie naar ongevaccineerde contact-dieren plaats.²⁵ Sinds 2010 is Clone 13 geregistreerd als veterinair vaccin in Zuid-Afrika voor runderen, schapen en geiten (er zijn reeds meer dan 19 miljoen doseringen toegediend).²⁸ Verder is Clone 13 de afgelopen 20 jaar veelvuldig in verscheidene laboratoria serieel *in vitro* of *in vivo* is gepasseerd zonder dat hierbij ooit reversie naar virulentie is waargenomen.²⁴

De COGEM merkt op dat voorzichtigheid geboden is wanneer Clone 13 wordt toegediend aan drachtige dieren. Er is namelijk gerapporteerd dat bij toediening van een overdosis van Clone 13 bij drachtige oaien, het virus de placenta kan passeren en kan leiden tot foetale infecties, doodgeboorte en congenitale afwijkingen (zoals aandoeningen aan het centraal zenuwstelsel of musculoskeletale stelsel).²⁵

Samenvattend concludeert de COGEM dat het natuurlijke replicatiecompetente RVFV Clone 13 vaccivirus geattenuëerd is in diverse diersoorten (m.u.v. drachtige dieren) ten opzichte van wildtype RVFV met functioneel NSs.

De COGEM is van oordeel dat de gg-RVFV varianten met een (partiële) deletie van NSs en een 3-gesegmenteerd genoom, waarmee de aanvrager voornemens is te gaan werken, geattenuëerd zijn ten opzichte van wildtype RVFV door de aanwezige (partiële) NSs deletie.

De aanvrager is, gezien de infectieroute van RVFV (via wondjes van de huid en overdraagbaar via aërosolen), voornemens tijdens de voorgenomen ggo-werkzaamheden handschoenen te dragen en alle open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet uit te voeren. Verder geeft de aanvrager aan dat zwangere vrouwen uit voorzorg worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden. De COGEM stemt in met de door de aanvrager voorgestelde maatregelen.

Concluderend adviseert COGEM de voorgenomen werkzaamheden omlaag te schalen van ML-III naar ML-II en hierbij de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen te hanteren. Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever> (bezoekt: 5 oktober 2020)
2. The World Organisation for Animal Health (OIE). Disease Information Summaries. Rift Valley fever. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Rift-Valley-fever/> (bezoekt: 7 oktober 2020)
3. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/> (bezoekt: 5 oktober 2020)
4. <https://www.cdc.gov/vhf/rvf/transmission/index.html> (bezoekt 29 januari 2020)
5. World Health Organization (WHO; 2010). *Rift Valley fever virus*. Factsheet no. 207. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever> (bezoekt: 7 oktober 2020)
6. Rift Valley fever. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RIFT_VALLEY_FEVER.pdf (bezoekt: 5 oktober 2020)
7. ICTV. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 5 oktober 2020)
8. Elliott RM *et al.* (2013). Chapter 42 *Bunyaviridae*. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
9. Plyusnin A *et al.* (2012). Family *Bunyaviridae*. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
10. Billecocq A *et al.* (2004). NSs protein of *Rift Valley fever virus* blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J. Virol.* 78: 9798-9806
11. Ikegami T *et al.* (2006). Rescue of infectious *Rift Valley fever virus* entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J. Virol.* 80: 2933-2940
12. Muller R *et al.* (1995). Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of *Rift Valley fever virus*, which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 405-411
13. Bouloy M *et al.* (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of *Rift Valley fever virus* non-structural protein NSs. *J. Virol.* 75: 1371-1377

14. von Teichman B *et al.* (2011). Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves. *Vaccine* 29: 5771-5777
15. Dingu B *et al.* (2010). Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine* 28: 4581-4587
16. Crabtree MB *et al.* (2012). Infection and Transmission of Rift Valley Fever Viruses Lacking the NSs and/or NSm Genes in Mosquitoes: Potential Role for NSm in Mosquito Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1639
17. Weingartl HM *et al.* (2014). Rift Valley fever virus incorporates the 78 kDa glycoprotein into virions matured in mosquito C6/36 cells. *PLoS One* 9: e87385
18. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVFV). COGEM advies CGM/080313-05
19. COGEM (2011). Inschaling werkzaamheden genetische gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVFV). COGEM advies CGM/110322-01 [vertrouwelijk]
20. COGEM (2012). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*. COGEM advies CGM/120716-02 [vertrouwelijk]
21. COGEM (2015). Omlaagschaling werkzaamheden met gg-*Rift Valley fever virus*. COGEM advies CGM/150518-02
22. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* in associatie met muggen en schapen. COGEM advies CGM/160630-01
23. COGEM (2020). Omlaagschaling van werkzaamheden met levend-verzwakt genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* vaccin. COGEM advies CGM/200204-02
24. Njenga MK *et al.* (2015). Randomized controlled field trial to assess the immunogenicity and safety of rift valley fever clone 13 vaccine in livestock. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003550.
25. Makoschey B *et al.* (2016). Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004550
26. Lo MM *et al.* (2015). Safety and immunogenicity of Onderstepoort Biological Products' Rift Valley fever Clone 13 vaccine in sheep and goats under field conditions in Senegal. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 82: 857
27. Von Teichman B *et al.* (2011). Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves. *Vaccine.* 29: 5771-5777
28. Faburay B *et al.* (2017). Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development. *Vaccines* 5: 29