

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 08 januari 2024
KENMERK CGM/240108-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met gg-Newcastle disease virus (NDV)

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 15-340_2.8-006 getiteld 'Omlaagschaling van handelingen met New Castle Disease Virus van ML-III naar ML-II en gesloten handelingen met dieren voor imaging op D-I', ingediend door het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

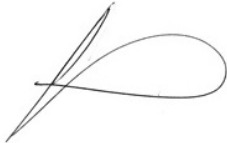
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg)-varianten van het Newcastle disease virus (*Orthoavulavirus javaense*, NDV). NDV veroorzaakt het besmettelijke 'Newcastle disease' ofwel pseudovogelpest.

De aanvrager is voornemens om MRI-metingen uit te voeren met gg-NDV geïnoculeerde muizen en verzoekt om een tijdelijke omlaagschaling naar inperkingsniveau D-I voor het verrichten van deze werkzaamheden. De hiervoor gebruikte gg-NDV varianten rNDV F0 en rNDV F0-M/S zijn gebaseerd op de laagpathogene NDV vaccinstam LaSota. De MRI-metingen worden twee weken na inoculatie met gg-NDV uitgevoerd. Experimentele gegevens in muizen tonen aan dat gg-NDV twee dagen na injectie niet meer via speeksel, urine of uitwerpselen uitgescheiden wordt. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans op uitscheiding en besmetting onwaarschijnlijk, onder navolging van een aantal aanvullende maatregelen.

Alles in overweging nemende stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde tijdelijke omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau D-I, met inachtneming van aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat tijdelijke omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden op D-I, onder navolging van de aanvullende voorschriften, een verwaarloosbaar klein risico oplevert voor mens en milieu.

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.
- Drs. Y de Keulenaar, 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. C.M.F. Dirven en dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Inschaling werkzaamheden met gg-Newcastle disease virus varianten

COGEM advies CGM/240108-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 15-340) over de inschaling van werkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde (gg-)Newcastle disease virus (NDV) varianten. De aanvraag is afkomstig van het Erasmus MC. De aanvrager is voornemens om MRI-metingen uit te voeren in muizen in associatie met een tweetal niet-virulente (lentogene) gg-NDV varianten. De aanvrager verzoekt een tijdelijke omlaagschaling van DM-II naar D-I voor het verrichten van deze werkzaamheden. Hierbij worden een aantal aanvullende voorschriften gehanteerd. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit inschalingsvoorstel met inbegrip van de aanvullende voorschriften.

2. Achtergrondinformatie over Newcastle Disease Virus

2.1 Newcastle disease

Newcastle disease virus (NDV) (*Orthoavulavirus javaense*, voorheen Avian paramyxovirus (APMV-1)) is een negatief enkelstrengs RNA-virus behorende tot het genus *Orthoavulavirus*, familie *Paramyxoviridae*.¹ Het virus kan 'Newcastle disease', ofwel pseudovogelpest, veroorzaken, een zeer besmettelijke ziekte bij vele soorten vogels, waaronder kippen, fazanten, duiven, papegaaien en valkparkieten. Newcastle disease is wereldwijd één van de belangrijkste pluimveeziektes en staat vermeld op de lijst van meldingsplichtige dierziekten van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE).^{2,3}

Niet elke vogelsoort is even gevoelig voor Newcastle disease; zo zijn kippen vatbaarder voor NDV dan eenden of ganzen. Ook variëren NDV-stammen in virulentie en weefseltropisme.³ Op basis van de virulentie van het virus bij geïnfecteerde kippen, worden NDV-stammen in verschillende pathotypen onderscheiden.^{3,4} De velogene (virulente) stammen veroorzaken ernstige systemische infecties met hoge morbiditeit en mortaliteit (beide oplopend tot wel 100%). Mesogene (niet tot matig-virulente) stammen veroorzaken luchtweginfecties, afname in de eiproductie en neurologische verschijnselen en hebben een lage mortaliteit (<10%). Lentogene (mild-virulente) stammen veroorzaken een milde infectie van de luchtwegen (niezen, hoesten) en een geringe afname in eiproductie. Als laatste zijn er ook virussen die asymptomatische infecties veroorzaken, waarbij de virusreproductie hoofdzakelijk in de darmen plaatsvindt.^{3,4,5}

NDV wordt overgedragen door direct contact met geïnfecteerde vogels, of indirect via contact met besmet voer, uitwerpselen, water of kleding. Daarnaast is NDV ook door de lucht overdraagbaar via aerosolen.^{3,4} Wereldwijd wordt pluimvee gevaccineerd tegen NDV met vaccinstammen afgeleid van lentogene virusstammen.¹² Mensen kunnen in potentie geïnfecteerd raken met NDV, zowel door virulente stammen alsook door niet-virulente vaccinstammen.⁸ Dergelijke infecties zijn zelflimiterend en leiden niet tot ernstige ziekte.⁸ Er zijn enkele sporadische gevallen van conjunctivitis bij mensen gerapporteerd.⁶ Er is onder andere een uitbraak van NDV in een

pluimveebedrijf beschreven, waarbij 40 personen geïnfecteerd raakten en kortdurende conjunctivitis ontwikkelden (3-4 dagen) zonder systemische symptomen.⁷ Mens-op-mens transmissie is nog nooit gerapporteerd.⁸ NDV kan efficiënter repliceren in humane kankercellen dan in normale humane cellen.^{9,14} Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er in normale cellen een interferon-respons opgang komt na infectie met NDV, terwijl interferon-signaalroutes vaak defect zijn in kankercellen.¹⁴ NDV wordt om deze reden als oncolytisch agens voor humaan gebruik toegepast.^{9,10,14}

2.2 Genomische organisatie van NDV

Het enkelstrengs negatief RNA-genoom van NDV is circa 15 kb groot en codeert voor zes eiwitten: het nucleocapside (N), het fosfoproteïne (P), het matrix-eiwit (M), het fusie-eiwit (F), het haemagglutinine-neuraminidase (HN) en het 'large' polymerase (L).^{11,12} Door 'RNA editing' tijdens de transcriptie van het P gen worden twee additionele eiwitten (genaamd V- en W-eiwit) geproduceerd.¹² Het RNA-afhankelijke RNA-polymerase bestaat uit de P- en L-eiwitten. Het RNA-genoom, ingepakt door het N-eiwit, vormt samen met het RNA-afhankelijke RNA-polymerase, een zogenaamd ribonucleoproteïne (RNP) complex. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De oppervlakte-glycoproteïnen HN en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn respectievelijk verantwoordelijk voor de binding aan sialzuur (SA) receptoren van de gastheercel, en fusie van de virale envelop met de gastheercel.^{11,12} Sialzuren zijn wijdverspreid aanwezig op het oppervlakte van alle celtypen van gewervelde en sommige 'hogere' ongewervelde dieren.¹³ De gehele replicatie-cyclus van NDV vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel.¹⁴

Het F-eiwit is een belangrijke bepalende factor voor NDV virulentie. Voordat nieuwgevormde virusdeeltjes infectieus zijn, moet het precursor F₀-molecuul door proteases van de gastheercel gesplitst worden in de F₁- en F₂-eiwitten. De F-eiwitten van lentogene NDV stammen bezitten een basisch aminozuur bij de klievingsplaats van het F₀ precursor-eiwit, en kunnen enkel door extracellulaire trypsine-achtige proteases die in de luchtweg- of maagdarmkanaalcellen van de gastheer aanwezig zijn, worden gesplitst. Virulente NDV-stammen hebben meerdere basische aminozuren bij de klievingsplaats van het F₀ precursor-eiwit.^{15,16} Deze kunnen door intracellulaire furine proteases die aanwezig zijn in vrijwel alle lichaamscellen, worden gekliefd. Hierdoor kunnen deze NDV-stammen in veel verschillende weefsels repliceren en fatale systemische infectie veroorzaken.^{12,14} Uit onderzoek blijkt dat aanpassing van het enkele basische aminozuur op de klievingsplaats van een lentogene stam naar een polybasisch motief, de virulentie doet toenemen.^{11,16,17} Het F-eiwit is echter niet de enige determinant voor virulentie. Ook van het HN-eiwit wordt verondersteld dat het een rol kan spelen bij de virulentie.¹⁸ Zo kan de virulentie van een lentogene stam ook verhoogd worden door substitutie van het HN-gen met dat van een virulente stam.¹⁷

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om MRI-metingen uit te voeren in muizen die geïnoculeerd zijn met non-virulente gg-NDV zonder polybasische klievingsplaats: rNDV F0 of rNDV F0-M/S. Hierbij gaat het om een recombinant van de lentogene LaSota vaccinstam (NDVF₀), namelijk rNDV F0, en een

variant afgeleid van deze vaccinstam: rNDV F0-M/S. De rNDV F0-M/S variant is ontstaan door het aanbrengen van twee mutaties nabij de klievingsplaats in het fusie-eiwit in rNDV F0. Hierdoor kan rNDV F0-M/S ook in zoogdiercellen geproduceerd worden zonder dat passage in kippeneieren nodig is.¹⁹ Deze mutaties verbeteren de virale replicatie in, en fusogeniciteit van tumorcellen. Tijdens de MRI-metingen zullen een aantal open handelingen met de met gg-NDV geïnoculeerde muizen uitgevoerd worden.

De aanvrager verzoekt om een tijdelijke omlaagschaling van DM-II naar D-I voor het uitvoeren van deze open handelingen met inachtneming van de volgende aanvullende maatregelen:

- De MRI metingen vinden minimaal 14 dagen na virus-inoculatie plaats;
- De deur van het D-I dierverblijf is voorzien van het biorisicoteken;
- De dieren in associatie met genetisch gemodificeerd virus worden vooraf, in het DM-II verblijf, in een gesloten eenheid gebracht, zoals beschreven in de aanvraag, en getransporteerd naar het D-I verblijf (MRI ruimte);
- De ‘imaging’ vindt plaats met inachtneming van het protocol en persoonsbeschermende maatregelen;
 - o haarnetjes
 - o mond-neusmaskers (chirurgisch masker type IIR);
 - o handschoenen
 - o OK-kleding (lange broek, lang-mouwen shirt, sokken en klompen)
 - o In de MRI-ruimte wordt een labjas over de hiervoor genoemde OK-kleding gedragen, welke bij het verlaten van deze ruimte weer uit gedaan wordt.
- Tijdens de werkzaamheden is de deur van de ruimte gesloten;
- Na afloop van de werkzaamheden worden de werkoppervlakken en meetopstellingen gedesinfecteerd en worden de dieren in associatie met genetisch gemodificeerd virus in de gesloten eenheid teruggebracht naar DM-II inperkingsniveau, zoals beschreven in de aanvraag.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2006 het wildtype NDV ingedeeld als dierpathogeen virus in pathogeniteitsklasse 3.^{20,21} In 2020 heeft de COGEM driemaal geadviseerd over NDV-gerelateerde vergunningaanvragen. In het eerste advies heeft de COGEM ingestemd met de omlaagschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met gg-LaSota waarin de sequentie van het Spike-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd was.²² In een tweede advies heeft de COGEM geadviseerd om de NDV vaccinstam LaSota en afgeleiden, welke een monobasische klievingsplaats in het F0-eiwit bevatten en waarvan een intracerebrale pathogeniteitsindex (ICPI) vastgesteld is van <0,7, in te delen in pathogeniteitsklasse 2 als strikt dierpathogeen.²³ In een derde advies heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met lentogene gg-NDVs waarin additionele modificaties waren aangebracht, n.a.v. een vergunningswijziging. Hierbij werd onder voorwaarden (het behoud van de monobasische klievingsplaats en een ICPI lager dan 0,7) gesteld, dat de voorgenomen werkzaamheden met deze gg-varianten konden worden uitgevoerd op ML-II en DM-II met aanvullende voorschriften.²⁴

In 2021 heeft de COGEM in een vertrouwelijk advies (wegens de aanwezigheid van door de aanvrager en vergunningverlener aangegeven vertrouwelijke gegevens) geadviseerd over werkzaamheden met twee niet-virulente gg-NDVs.²⁵ Deze gg-NDVs repliceren verminderd in cellen van gevogelte en in geëmbryoneerde kippen- en eendeneieren. De COGEM stemde hierbij in met de laboratoriumwerkzaamheden op ML-II met inachtneming van aanvullende voorschriften. Verder stemde de COGEM in met een inschaling van werkzaamheden met de geattenueerde gg-NDV varianten in associatie met dieren op DM-II. Hierbij stelt de COGEM als voorwaarden dat:

- Er geen seriële passages uitgevoerd zullen worden met de gg-varianten;
- De te gebruiken weefsels afkomstig zullen zijn van NDV-vrij gevogelte.

Daarnaast dienen de volgende aanvullende voorschriften te worden gehanteerd voor activiteiten met gevogelte en kleine zoogdieren:

- De dieren zijn gehuisvest in filtertopkooien;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

of

- De huisvesting en alle handelingen van de dieren vinden plaats in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met twee gg-varianten, rNDV F0 en rNDV F0-M/S. Er wordt van de gg-varianten gesteld dat zij geattenueerd en lentogeen zijn. De NDV uitgangsstam die de aanvrager voornemens is te gebruiken voor de gg-NDV varianten, is de LaSota stam. De lentogene (avirulente) LaSota stam is door de COGEM beoordeeld als strikt dierpathogeen en repliceert hoofdzakelijk in de luchtwegen van kippen. Deze stam kent een lange historie van veilig gebruik als levend vaccin om pluimvee tegen Newcastle disease te beschermen.²⁶ Daarnaast is de stam in verscheidene pre-klinische studies onderzocht voor toepassing als recombinante vaccinator om mensen en dieren tegen pathogenen te vaccineren of als oncolytisch agens voor humaan gebruik.^{14,28}

De aanvrager is voornemens om muizen met de gg-NDV te inoculeren om vervolgens twee weken na inoculatie tijdelijke werkzaamheden uit te voeren op D-I. Tijdens de werkzaamheden zullen een aantal open handelingen uitgevoerd worden. De aanvrager heeft een risicobeoordeling aangeleverd voor deze werkzaamheden. De aanvrager geeft daarbij aan dat er geen aanwijzingen zijn dat de muizen na twee weken nog gg-NDV uitscheiden en dat de muizen hierdoor een biologische inperking vormen. Dit wordt onderbouwd met wetenschappelijke literatuur. Uit experimentele gegevens blijkt dat bij immunogecompromitteerde muizen geen virale uitscheiding optreedt in speeksel, urine of uitwerpselen twee dagen na de laatste injectie met vergelijkbare gg-NDV varianten.²⁷ Door de detectielimiet van de qRT-PCR assay kan niet geheel uitgesloten worden dat zeer geringe uitscheiding zou kunnen optreden. Echter

in de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van immuuncompetente muizen, waardoor naar verwachting minder efficiënte virusreproductie en minder uitscheiding zal optreden. Hierdoor is het onwaarschijnlijk dat uitscheiding of transmissie plaats zal vinden. Uit een gepubliceerde studie blijkt dat in apen geïnjecteerd met LaSota gg-NDV varianten, twee dagen na de laatste injectie geen infectieus virus meer werd aangetoond in neus, keel en rectum.²⁸ In een aantal weefsels (milt, nier, long) werd wel viraal RNA aangetoond, maar geen infectieus virus. Daarnaast liet deze studie zien dat er geen transmissie optrad van geïnfecteerde apen naar naïeve dieren. De COGEM acht, op basis van de bovenstaande experimentele gegevens, het onwaarschijnlijk dat muizen virus zullen uitscheiden twee weken na infectie met de gg-NDV-F0 varianten.

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde tijdelijke inschaling van de werkzaamheden op D-I en de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. Naast de door de aanvrager voorgestelde voorschriften, stelt de COGEM als aanvullend voorschrift dat materialen (inclusief de labjas) na gebruik gesteriliseerd of gedesinfecteerd moeten worden. De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenoemde werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 18 december 2023)
2. Alexander DJ *et al.* (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41: 329-335
3. OIE-World Organisation for Animal Health. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Newcastle-disease/> (bezoekt: 18 december 2023)
4. Wageningen University & Research (WUR). Newcastle disease (psuedovogelpest). <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Bioveterinary-Research/Dierziekten/Virusziekten/Newcastle-disease-3.htm> (bezoekt: 18 december 2023)
5. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Chapter 1: Newcastle disease virology and epidemiology. <http://www.fao.org/3/y5162e/y5162e02.htm> (bezoekt: 18 december 2023)
6. Lippmann O (1952). Human conjunctivitis due to the Newcastle-disease virus of fowls. *Am. J. Ophthalmol.* 35: 1021-1028
7. Nelson CB *et al.* (1952). An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. *Am. J. Public Health Nations Health* 42: 672-678
8. Alexander DJ (2000). Newcastle disease and other avian paramyxovirus. *Rev. Sci. Tech.* 19: 443-462
9. National Cancer Institute. Newcastle Disease Virus (PDQ®)–Health Professional Version. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/ndv-pdq> (bezoekt: 18 december 2023)
10. Freeman AI *et al.* (2006). Phase I/II trial of intravenous ndv-huj oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther.* 13: 221-228

11. Peeters BP *et al.* (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73: 5001-5009
12. Ganar K *et al.* (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Res.* 184: 71-81
13. Varki A (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 14: 351–360
14. Bello MB *et al.* (2020). Exploring the prospects of engineered Newcastle disease virus in modern vaccinology. *Viruses* 12: 451
15. Kim SH *et al.* (2012). Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks. *PLoS ONE* 7: e34927
16. Römer-Oberdörfer A *et al.* (2003). Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 84: 3121-3129
17. Römer-Oberdörfer A *et al.* (2006). Enhancement of Pathogenicity of Newcastle Disease Virus by Alteration of Specific Amino Acid Residues in the Surface Glycoproteins F and HN. *Avian Diseases* 50: 259-263
18. Yuan P *et al.* (2012). Structure of the Ulster Strain Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Reveals Auto-Inhibitory Interactions Associated with Low Virulence. *PLoS Pathog.* 8: e1002855
19. De Graaf J (2023). Newcastle disease virus and its application in oncolytic viroimmunotherapy for treatment of pancreatic cancer patients. Proefschrift Erasmus Universiteit Rotterdam
20. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen – criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
21. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/190905-02
22. COGEM (2020). Inschaling van werkzaamheden met een recombinant Newcastle disease virus met spike van SARS-CoV-2. COGEM advies CGM/200605-01
23. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van de Newcastle disease virus (NDV) vaccinstam LaSota (en afgeleiden). COGEM advies CGM/201202-02
24. COGEM (2020). Inschaling van werkzaamheden met gg-Newcastle disease virus (NDV) n.a.v. een wijziging van een eerdere vergunning. COGEM advies CGM/201202-03
25. COGEM (2021) Vertrouwelijk COGEM advies CGM/210506-01
26. Goldhaft TM (1980). Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 24: 297-301
27. de Graaf, FJ *et al.* (2022). Comparison between intratumoral and intravenously administered oncolytic virus therapy with Newcastle disease virus in a xenograft murine model for pancreatic adenocarcinoma. *Heliyon* 8
28. Buijs PRA *et al.* (2014). Intravenously injected Newcastle disease virus in non-human primates is safe to use for oncolytic virotherapy. *Cancer Gene Ther.* 21: 463-471