

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu  
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat  
De heer Ch.A. Jansen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 06 februari 2025  
**KENMERK** CGM/250206-01  
**ONDERWERP** Advies wijziging verzoek tot omlaagschaling van handelingen met muizen met gg-NDV

Geachte heer Jansen,

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vivo* werkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde (gg-)Newcastle disease virus (NDV-) varianten (IG 15-340\_2.8-007). De aanvraag is afkomstig van het Erasmus MC en betreft een wijziging van een eerdere vergunning waarover de COGEM in januari 2024 heeft geadviseerd.<sup>1</sup> De aanvrager is voornemens om MRI-metingen uit te voeren bij muizen die geïnoculeerd zijn met de mild-virulente (lentogene) gg-NDV varianten rNDV F<sub>0</sub> of rNDV F<sub>0</sub>-M/S. De muizen zijn gehuisvest op DM-II, maar de MRI-werkzaamheden zullen plaatsvinden op inperkingsniveau D-I. In een eerdere aanvraag heeft de aanvrager verzocht om een wachttijd van 14 dagen na virus-inoculatie te hanteren voor de tijdelijke verplaatsing van de geïnoculeerde muizen van DM-II naar D-I. De COGEM achtte het destijds onwaarschijnlijk dat de muizen twee weken na infectie nog gg-NDV zouden uitscheiden en kon derhalve instemmen met het verzoek tot tijdelijke omlaagschaling.<sup>1</sup> In de huidige wijziging verzoekt de aanvrager deze wachttijd te verkorten naar 7 dagen. Ter onderbouwing heeft de aanvrager resultaten aangeleverd van een eigen onderzoek naar uitscheiding van het virus.

### 1. Achtergrondinformatie NDV-varianten

Newcastle disease virus (NDV) is bekend als de veroorzaker van 'Newcastle disease', ofwel pseudovogelpest; een zeer besmettelijke vogelziekte. NDV kan efficiënter repliceren in humane kankercellen dan in normale humane cellen en wordt om deze reden onderzocht als oncolytisch agens bij mensen.

---

1. COGEM (2024). Inschaling werkzaamheden met gg-Newcastle disease virus varianten. COGEM advies CGM/240108-02.

De NDV-varianten rNDV F<sub>o</sub> en rNDV F<sub>o</sub>-M/S zijn afgeleid van de lentogene LaSota vaccinstam. LaSota wordt toegepast als vaccin tegen Newcastle disease en wordt onderscheiden van virulente NDV-stammen door de aanwezigheid van een monobasisch aminozuur bij de klievingsplaats van het F<sub>o</sub>-eiwit. Hierdoor kan het F-eiwit enkel door extracellulaire trypsine-achtige proteases, die in de luchtweg- of maagdarmkanaalcellen van de gastheer aanwezig zijn, worden gesplitst. Dit beperkt het tropisme van de LaSota vaccinstam tot het luchtweg- en darmstelsel. rNDV F<sub>o</sub> is een recombinant van de lentogene LaSota vaccinstam en de rNDV F<sub>o</sub>-M/S variant is ontstaan door het aanbrengen van twee mutaties nabij de klievingsplaats in het fusie-eiwit in rNDV F<sub>o</sub>. Hierdoor kan rNDV F<sub>o</sub>-M/S ook in zoogdiercellen geproduceerd worden zonder dat passage in kippeneieren nodig is. Deze mutaties verbeteren onder andere de virale replicatie in tumorcellen.

## 2. Verzoek tot omlaagschaling

De rNDV-varianten zullen getest worden in het kader van oncolytische virotherapie in een muizenmodel voor alvleesklierkanker. De muizen worden geïnoculeerd met de gg-NDV-F<sub>o</sub> varianten rNDV F<sub>o</sub> of rNDV F<sub>o</sub>-M/S en gehuisvest op DM-II. De aanvrager verzoekt om de muizen 7 dagen na inoculatie met gg-NDV tijdelijk van DM-II naar inperkingsniveau D-I te verplaatsen ten behoeve van MRI-metingen (open handelingen). De aanvrager heeft aangegeven hierbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- De MRI metingen vinden minimaal 7 dagen na virus-inoculatie plaats;
- De deur van het D-I dierverblijf is voorzien van het biorisicoteken;
- De dieren in associatie met gg-virus worden vooraf in het DM-II verblijf in de 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 zoals beschreven in de aanvraag;<sup>2</sup>
- Tijdens de werkzaamheden is de deur van de ruimte gesloten;
- De dieren in associatie met gg-virus worden na afloop van de werkzaamheden in de gesloten eenheid teruggebracht naar het inperkingsniveau waar ze in de gesloten eenheid zijn gebracht;
- Na afloop van de werkzaamheden worden materialen (inclusief labjassen), werkoppervlakken en meetopstellingen gedesinfecteerd, zoals beschreven in de aanvraag.

## 3. Analyse uitscheiding

Om aan te tonen dat er geen uitscheiding plaatsvindt door muizen geïnoculeerd met rNDV F<sub>o</sub> of rNDV F<sub>o</sub>-M/S, heeft de uitvoerder gedurende 14 dagen na de laatste inoculatie monsters afgenomen van de geïnfecteerde muizen en geanalyseerd op aanwezigheid van gg-NDV RNA. Vanaf 24 uur na de laatste inoculatie met gg-NDV is om de dag speeksel, urine en feces van 18 muizen (9 geïnoculeerd met NDV F<sub>o</sub> en 9 met NDV F<sub>o</sub> M/S) verzameld. Deze monsters zijn geanalyseerd op aanwezigheid van gg-NDV RNA met een 'real-time reverse-transcription' PCR

---

2. Hieronder wordt verstaan: haarnetjes, mond-neusmaskers (chirurgisch masker type IIR), handschoenen, OK-kleding (lange broek, lang-mouwen shirt, sokken en klompen), en in de MRI-ruimte wordt een labjas over de OK-kleding gedragen, welke bij het verlaten van deze ruimte uitgedaan wordt.

(RRT-PCR of qRT-PCR) gebaseerd op het matrix (M-)eiwitgen.<sup>3</sup> Als interne controle voor het RNA-isolatieproces en de qRT-PCR is Phocine distempervirus (PDV) toegevoegd aan de lysisbuffer. Als negatieve en positieve controle is in elke qRT-PCR plaat respectievelijk water en NDV ( $\pm 1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) gebruikt. In de publicatie over deze assay wordt een detectielimiet van  $10^3$  RNA kopieën en ongeveer 10 EID<sub>50</sub> ('50 percent Embryo Infectious Dose') genoemd. De aanvrager heeft deze assay zelf getest op een verdunningsreeks van een 'virus stock' van rNDV F<sub>0</sub> of rNDV F<sub>0</sub>-M/S, waarbij de minimale detectielimiet bepaald is op 10 TCID<sub>50</sub> ('50% tissue culture infectious dose') voor NDV F<sub>0</sub>, en 50 TCID<sub>50</sub> voor NDV F<sub>0</sub> M/S. Wanneer bij de qRT-PCR van een speeksel- urine- of fecesmonster een 'cycle threshold' (Ct) waarde van 40 (i.e., het maximale aantal cycli) wordt uitgelezen, zal het monster minder dan 10 of 50 TCID<sub>50</sub> rNDV F<sub>0</sub> of rNDV F<sub>0</sub>-M/S bevatten. Voor alle monsters van de geïnoculeerde muizen is een Ct waarde van 40 uitgelezen. Hieruit concludeert de aanvrager dat er geen viraal RNA werd gedetecteerd, en derhalve geen uitscheiding van NDV F<sub>0</sub> en NDV F<sub>0</sub> M/S plaatsvindt. Ook zijn er door de aanvrager enkele publicaties aangeleverd waarin dezelfde qRT-PCR toegepast wordt om NDV te detecteren in verschillende monsters afkomstig van apen,<sup>4</sup> kippen<sup>5</sup> en immuungecompromitteerde muizen.<sup>6</sup>

#### 4. Overweging en advies

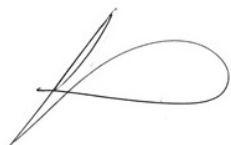
De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met het inkorten van de wachttijd van 14 naar 7 dagen voor tijdelijke omlaagschaling van DM-II naar D-I om MRI-metingen uit te voeren met gg-NDV geïnoculeerde muizen. De COGEM heeft in een eerder advies<sup>1</sup> opgemerkt dat in verschillende publicaties de uitscheiding van infectieus virus door apen<sup>4</sup> of immuungecompromitteerde muizen<sup>6</sup> enkele dagen na experimentele infectie met vergelijkbare gg-NDV varianten, niet meer waarneembaar is. In de onderhavige aanvraag is door de aanvrager een analyse uitgevoerd op urine-, feces- en speekselsamples van muizen geïnoculeerd met rNDV F<sub>0</sub> of rNDV F<sub>0</sub>-M/S. In geen van de onderzochte samples is gg-NDV RNA gedetecteerd. Op basis van de aangeleverde informatie is de COGEM van oordeel dat de qRT-PCR een geschikte methode is om afwezigheid van gg-NDV te bevestigen. Er kan nooit volledig uitgesloten worden dat er geen enkel gg-NDV deeltje uitgescheiden wordt, maar de detectiegrens van de test is dusdanig laag dat de hoeveelheid ongedetecteerde virusdeeltjes geen risico zal vormen voor infectie en verdere verspreiding. Op basis van de resultaten van de analyses van de aanvrager, en vergelijkbare studies, is de COGEM van oordeel dat de kans dat muizen 7 dagen na infectie met de gg-NDV-F<sub>0</sub> varianten dit virus zullen uitscheiden, verwaarloosbaar klein is.

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde wachttijd van 7 dagen voor de tijdelijke inschaling van de werkzaamheden op D-I, met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is

- 
3. Wise MG *et al.* (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 42: 329-338.
  4. 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
  5. De Graaf JF *et al.* (2022). Assessment of the virulence for chickens of Newcastle disease virus with an engineered multi-basic cleavage site in the fusion protein and disrupted V protein gene. *Vet. Med.* 269: 109437
  6. 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

van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, characteristic of the name Sybe Schaap.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

***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.***

c.c.

- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal