

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 17 augustus 2017
KENMERK CGM/170817-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden gg-*African swine fever virus* in de HCU

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-086_2.8-000 getiteld 'Uitvoering van werkzaamheden met een strikt dierpathogeen virus van pathogeniteitsklasse PG-4 (*African swine fever virus*; ASFV) op ML-III en DM-III inperkingsniveau in de High Containment Unit (HCU) van WBVR', ingediend door Stichting Wageningen Research, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

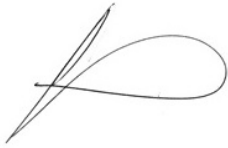
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *African swine fever virus* (ASFV). De aanvrager wil gg-varianten van ASFV produceren ten behoeve van vaccinontwikkeling. De werkzaamheden betreffen laboratoriumwerkzaamheden en werkzaamheden in associatie met proefdieren, en zullen uitgevoerd worden in de High Containment Unit (HCU) in Lelystad. De inrichtings- en werkvoorschriften in de HCU verschillen van de in Regeling ggo vermelde inrichtings- en werkvoorschriften, omdat dierpathogenen geen mensen kunnen infecteren.

ASFV kan bij varkens een zeer besmettelijke en ernstige ziekte veroorzaken en is daarom ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4. De COGEM heeft eerder in een generiek advies geoordeeld dat de ML-III ruimte binnen de HCU voldoet aan de eisen die de COGEM stelt voor werkzaamheden met een klasse 4 dierpathogeen. De COGEM is van mening dat de werkzaamheden met gg-ASFV onder ML-III en DM-III inperkingsniveau met de in het advies genoemde maatregelen kunnen plaatsvinden in de HCU, conform de voorgestelde maatregelen in het eerdere algemene advies.

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,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangverstrengelingen zijn COGEM leden dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *African swine fever virus* (ASFV) in de High Containment Unit van Wageningen UR

COGEM advies CGM/170817-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag IG 17-086, ingediend door Stichting Wageningen Research, is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *African swine fever virus* (ASFV). De aanvrager is voornemens (partiële) deletiemutanten te creëren ten behoeve van vaccinantwikkeling. De voorgenumen activiteiten zullen plaatsvinden in de High Containment Unit (HCU) van Wageningen Bioveterinary Research (WBVR). Omdat deze aanvraag een (geattenuerd) strikt dierpathogeen betreft, en gezien de inrichtings- en werkvoorschriften van de HCU, verzoekt de aanvrager werkzaamheden met gg-ASFV uit te mogen voeren op ML-III en DM-III niveau.

2. *African swine fever virus*

African swine fever virus (ASFV) is de enige soort behorende tot het genus *Asfivirus* en heeft een lineair dubbelstrengs DNA genoom van 170-190 kbp. Het genoom bevat tussen de 151 en 167 open reading frames (ORFs) die van beide DNA strengen worden afgelezen.¹ De transcriptie van de virale genen is chronologisch gereguleerd. Voorafgaand aan de DNA replicatie komen de ‘immediate-early’ en ‘early’ genen tot expressie, en na de replicatie komen de ‘intermediate’ en ‘late’ genen tot expressie. Ongeveer 20% van het genoom van ASFV is betrokken bij de transcriptie en modificatie van mRNA.²

ASFV infecteert gedomesticeerde varkens (*Sus scrofa domesticus*), wilde varkens (*S. s. ferus*), wrattenzwijnen (*Phacochoerus* spp.), boszwijnen (*Potamochoerus* spp.) en reuzenboszwijnen (*Hylochoerus meinertzhageni*).^{1,3} ASFV veroorzaakt hemorrhagische koorts met een hoge mortaliteit in gedomesticeerde en wilde varkens, terwijl infectie met ASFV vaak asymptomatisch verloopt in wilde Suina (varkensachtigen), die tevens als natuurlijk reservoir dienen.^{1,3,4} In wilde en gedomesticeerde varkens wordt het virus voornamelijk overgedragen door lederteken van het genus *Ornithodoros*.^{2,5} Andere manieren waarop varkens geïnfecteerd kunnen raken is door direct contact met geïnfecteerde dieren, het eten van geïnfecteerd vlees, via fomites, en door steekvliegen.²

African swine fever (ASF) staat vermeld op de lijst met meldingsplichtige dierziekten van de ‘World Organisation for Animal Health’ (OIE).⁶ Een uitbraak kan zeer grote economische gevolgen hebben.⁴ ASF kan niet onderscheiden worden van klassieke varkenspest en laboratoriumonderzoek (zoals PCR) is nodig om het virus te identificeren.⁵ Isolaten van ASFV kunnen verschillen in virulentie. Virulente isolaten kunnen 100% mortaliteit veroorzaken in 5-10 dagen, terwijl minder virulente isolaten een gereduceerde mortaliteit (van ongeveer 50%) hebben.¹

3. High Containment Unit (HCU)

In de HCU van het WBVR wordt gewerkt met strikt dierpathogene organismen, en de HCU wijkt daarom op enkele punten af van de standaard inrichtings- en werkvoorschriften, vermeld in bijlage 9

van de Regeling ggo.⁷ De HCU is een gebouw dat zodanig is afgeschermd dat pathogenen niet naar buiten kunnen ontsnappen. Hiervoor worden twee inperkingen onderscheiden, de primaire en secundaire inperking. Voor de primaire inperking geldt dat alle werkzaamheden plaats moeten vinden in een klasse IIb veiligheidskabinet, of hoger. Onder de secundaire inperking gelden maatregelen zoals een gasdichte afscheiding tussen de HCU en de omgeving, onderdruk binnen de HCU, sterilisatie van al het afval, verplicht douchen voor medewerkers, en quarantaineregelingen. De HCU heeft een fysisch inperkingsniveau van ML-III+/DM-III+ niveau.

In 2017 zijn de alternatieve inrichtings- en werkvoorschriften welke gehanteerd worden in de HCU, vastgelegd in beschikking IG 17-060_atv-000. In deze beschikking zijn de inrichtings- en werkvoorschriften gespecificeerd voor verschillende handelingen op inperkingsniveau III en onderverdeeld in leden. Onder lid I mogen handelingen met strikt dierpathogene ggo's al dan niet in combinatie met apathogene ggo's uitgevoerd worden. Onder lid II mag gewerkt worden met strikt dierpathogene ggo's al dan niet in combinatie met humaan pathogene ggo's van maximaal klasse 2. Onder lid III mogen handelingen uitgevoerd worden met humaan pathogene ggo's van klasse 3. Onder lid IV mogen handelingen uitgevoerd worden met grote proefdieren, in associatie met strikt dierpathogene ggo's al dan niet in combinatie met humaan pathogene ggo's van maximaal klasse 2.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om ASFV isolaat Georgia/2007⁸ genetisch te modificeren met behulp van CRIPSR/Cas9 door het aanbrengen van deleties en inserties. Eén of meerdere genen van ASFV zullen gedeleteerd worden en/of de expressie van één of meerdere ASFV eiwitten zal verhinderd worden.

Het Cas9 eiwit en het sgRNA wordt d.m.v. transfectie met plasmiden of transductie met lentivirale partikels in geschikte gastheercellen tot expressie gebracht, gevolgd door infectie met wildtype ASFV. Voor deleties wordt gebruik gemaakt van Cas9 en sgRNA sequenties zonder donorsequenties. Voor insertie van donorsequenties wordt gebruikt gemaakt van een donorplasmide (of DNA fragment) met een marker- of reporter gen (niet coderend voor schadelijke genproducten). Dit DNA wordt geflankeerd door 20 nucleotiden overeenkomend met de ASFV targetsequentie. Hierdoor knipt Cas9 niet alleen de ASFV targetsequentie, maar ook het donor DNA fragment, en wordt via 'homology-independent targeted integration' het donor DNA met relatief hoge frequentie ingebouwd in het genoom van ASFV. Tenslotte zal de aanvrager de gg-ASFV virusstock opwerken door middel van plaquezuivering.

De geproduceerde gg-ASFV partikels zullen vervolgens gebruikt worden om animale cellen en varkens te infecteren. Tenslotte is de aanvrager voornemens werkzaamheden uit te voeren met cellen en weefsels van de varkens die geïnfecteerd zijn met gg-ASFV.

5. Eerdere COGEM adviezen

ASFV is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.⁹ De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met ASFV. In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de criteria en inschaling van werkzaamheden met dierpathogene virussen.¹⁰ Hierin stelt de COGEM:

“Een groot aantal van de inrichtingsvoorschriften van ML-III en ML-IV laboratoria zijn er juist op gericht de laboratoriummedewerker te beschermen tegen het risico van infectie met het pathogeen waarmee gewerkt wordt. Gezien de afwezigheid van dergelijke risico’s bij werkzaamheden met dierpathogene virussen, zijn een aantal van deze inrichtingsvoorschriften feitelijk overbodig.” [...] “De inrichtingsvoorschriften voor werkzaamheden met dierpathogene virussen zijn er primair op gericht verspreiding van het pathogeen naar het milieu tegen te gaan. Dit betekent dat sommige maatregelen niet op de grens van het laboratorium genomen hoeven te worden (zoals sluisen, doorgeefautoclaven, verhoogde drempels ter voorkoming van het weglekken van vloeistoffen uit de ruimte). Het is even effectief uit het oogpunt van het tegengaan van verspreiding van ggo’s of dierpathogene virussen om deze maatregelen te nemen op de grens van een unit met meerdere ruimten en de buitenwereld.”

Voor pathogeniteitsklasse 4 heeft de COGEM in dit generieke advies de volgende inrichtings- en werkvoorschriften gedefinieerd:

“Laboratorium- en proefdierexperimenten dienen in gebouwen plaats te vinden die voldoen aan de ML-IV of DM-IV inrichtings- en werkvoorschriften met de volgende aanpassingen:

- Het is toegestaan dat de toegangssluis met een douche op de grens van het onderdrukgebied gesitueerd is, bijvoorbeeld op de overgang tussen gebouw en buitenwereld. De ggo-werkruimte bevindt zich in het onderdrukgebied;*
- Een drempel bij iedere deur in het kozijn is niet noodzakelijk, maar wel op de grens van het onderdrukgebied;*
- Zichtcontact met medewerkers in de werkruimte is niet noodzakelijk;*
- Een doorgeefautoclaaf is aanwezig op de grens van het onderdrukgebied;*
- Een veiligheidskabinet van tenminste klasse II is in de werkruimte aanwezig;*
- Het dragen van volledig beschermende kleding, zogenaamde 'maanpakken', is niet noodzakelijk. Het dragen van passende beschermende kleding zoals voor pathogeniteitsklasse 3 pathogenen geldt, is voldoende.”*

De COGEM heeft eerder geadviseerd werkzaamheden met strikt dierpathogenen van pathogeniteitsklasse 4 in te schalen op inperkingsniveau ML-III/DM-III in de HCU. Het betrof hier het gg-mond-en-klauwzeervirus (*Foot-and-mouth disease virus*) en gg-varkenspestvirus (*Hog cholera virus*).^{11,12}

6. Overweging en advies

ASFV is een zeer besmettelijk virus dat ernstige ziekte en sterfte kan veroorzaken in gedomesticeerde en wilde varkens. Mensen zijn niet vatbaar voor infectie met ASFV. ASFV wordt daarom beschouwd als een strikt dierpathogeen van klasse 4. Volgens de Regeling ggo moeten werkzaamheden met een klasse 4 pathogeen in een ML-IV ruimte plaatsvinden. Deze indelingscriteria en de daarbij geldende inrichtings- en werkvoorschriften zijn echter gebaseerd op humaan pathogenen, en zijn deels ontwikkeld ter voorkoming van de verspreiding in het milieu via besmetting van de laboratoriummedewerker. Bij strikt dierpathogenen hoeven er geen maatregelen voorgeschreven worden om de

laboratoriummedewerker te beschermen. De inrichtings- en werkvoorschriften van de ML-III ruimte binnen de HCU zijn hierop aangepast.

De COGEM heeft eerder geadviseerd om *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met een strikt dierpathogeen uit pathogeniteitsklasse 4 in te schalen op inperkingsniveau ML-III/DM-III in de HCU.^{11,12} Onderdeel van de secundaire inperking van de HCU is het verplicht douchen bij het verlaten van het gebouw, en het hanteren van een quarantaineperiode van 72 uur ter bescherming van mond-en-klauwzeer gevoelige dieren, waar ook varkens onder vallen. Bij inachtneming van deze maatregelen bij werkzaamheden met gg-ASFV acht de COGEM de kans op uitsleep van het virus vanuit de HCU verwaarloosbaar klein. De COGEM is daarom van oordeel dat ook werkzaamheden met gg-ASFV uitgevoerd kunnen worden op inperkingsniveau ML-III of DM-III, met inachtneming van de aangepaste inrichtings- en werkvoorschriften in de HCU.

6.1 Productiewerkzaamheden

De aanvrager wil gg-ASFV produceren door middel van transfectie, of transductie met behulp van derde generatie SIN lentivirale partikels met Cas9 en sgRNA sequenties gericht tegen genen van ASFV. Voor productiewerkzaamheden door middel van transfectie, adviseert de COGEM de inrichtings- en werkvoorschriften uit lid I van beschikking IG 17-060_atv-000 te hanteren.

De lentivirale partikels worden geproduceerd door middel van een 3^e generatie lentiviraal systeem. Infectie van zoogdiercellen met 3^e generatie SIN-lentivirale vectoren heeft de COGEM eerder ingeschaald op inperkingsniveau ML-II.¹³ Voor productiewerkzaamheden door middel van transductie met lentivirale partikels, adviseert de COGEM daarom de inrichtings- en werkvoorschriften uit lid II van beschikking IG 17-060_atv-000 te hanteren. Bij werkzaamheden met lentivirale partikels dient rekening gehouden te worden met de mogelijke aanwezigheid van lentivirussen in het gastheermateriaal. Bij aanwezigheid van lentivirussen bestaat de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus door recombinatie en/of complementatie. Derhalve adviseert de COGEM om bij de productiewerkzaamheden met lentivirale partikels het volgende aanvullende voorschrift in acht te nemen:

- De te gebruiken cellen zijn vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

6.2 Infectie van animale cellen en handelingen met cellen/weefsels afkomstig van dierverblijf

Het gg-ASFV dat vervaardigd is met de productiewerkzaamheden beschreven in 6.1 zal gebruikt worden om cellen te infecteren. Ook zullen varkens geïnfecteerd worden, en worden werkzaamheden uitgevoerd met cellen en weefsels afkomstig van de geïnfecteerde dieren.

Bij productiewerkzaamheden met lentivirale systemen kan het zijn dat de te produceren gg-ASFV virusstock lentivirale partikels bevat. Reductie van de lentivirale partikels wordt onder meer bewerkstelligd door plaquezuivering en kweek- en wasprocedures. De COGEM heeft in 2005 geadviseerd over de risico's van handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen bij ingeperkt gebruik, en een formule opgesteld om de reductie van vrije vectordeeltjes te bepalen.¹⁴ De aanvrager stelt dat op basis van de halfwaardetijd van de lentivirale partikels (VSV-G

gepseudotypeerd; ca. 10 uur bij 37°C), de vries-dooi behandeling voor virusisolatie, de verdunningen voor plaquezuivering, er geen infectieuze lentivirale partikels meer aanwezig zullen zijn in de gg-ASFV stock die gebruikt zal worden om varkens te infecteren. Uitgaande van een enkele wasstap, en 15 dagen incubatie bij 37°C, is de reductieratio $> 10^{12}$. De COGEM is van oordeel dat de toe te dienen virusstock vrij zal zijn van lentivirale partikels. De COGEM gaat er van uit dat deze virusstock gebruikt zal worden voor zowel de infectie van cellen, als de infectie van varkens. Gezien de afwezigheid van lentivirale partikels adviseert de COGEM, anders dan het voorstel tot inschaling van BGGO, voor werkzaamheden met gg-ASFV en animale cellen (al dan niet afkomstig van dierverblijf) de inrichtings- en werkvoorschriften opgenomen in lid I van beschikking IG 17-060_atv-000 in acht te nemen. Ook acht de COGEM verdere aanvullende voorschriften niet noodzakelijk. Dit is in lijn met het generieke advies over werkzaamheden met lentivirale vectoren.¹³

6.3 In vivo handelingen – infectie van varkens

Voor de *in vivo* werkzaamheden adviseert de COGEM een inschaling op DM-III niveau, waarbij de voorschriften opgenomen in het lid IV van beschikking IG 17-060_atv-000 worden gehanteerd. Zoals beschreven in voorgaande alinea, is de COGEM van oordeel dat de toe te dienen virusstock vrij zal zijn van lentivirale partikels, en acht zij verdere aanvullende voorschriften daarom niet noodzakelijk.

7. Conclusie

Volgens de COGEM bieden de voorgestelde inperkingsmaatregelen en –voorschriften in de HCU vastgelegd in beschikking IG 17-060_atv-000 voldoende inperking om werkzaamheden met gg-ASFV op inperkingsniveau ML-III en DM-III uit te voeren. De COGEM is van oordeel dat wanneer bovengenoemde inschaling en de in het advies genoemde maatregelen in acht worden genomen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Dixon LK *et al.* (2009). Asfarviridae Chapter Version: ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy release. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/99/asfarviridae (bezoekt: 25 juli 2017)
2. Galindo I & Alonso C (2017). African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses* 9 pii: E103
3. World Organisation for Animal Health (OIE; 2016). Terrestrial Animal Health Code, section 15 Suidae. Chapter 15.1. African swine fever.
4. Costard S *et al.* (2009). African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364: 2683-2696
5. World Organisation for Animal Health (OIE; 2012) Terrestrial Manual. Section 2.8 Suidae. Chapter 2.8.1. African swine fever
6. World Organisation for Animal Health (OIE; 2017). Listed Diseases 2017. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/> (bezoekt: 25 juli 2017)
7. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - Bijlage 9

8. Chapman DAG *et al.* (2011). Genomic Analysis of Highly Virulent Isolate of African Swine Fever Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 599-605
9. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2017). COGEM advies CGM/170522-03
10. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
11. COGEM (2006). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Mond-en-klauwzeervirus*. COGEM advies CGM/060711-01
12. COGEM (2007). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Hog cholera virus* (varkenspestvirus) en *Bovine viral diarrhea virus*. COGEM advies CGM/070626-03
13. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
14. COGEM (2005). Advies Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. COGEM advies CGM/051215-01