

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

**DATUM** 28 maart 2017  
**KENMERK** CGM/170328-05  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsklasse *Venezuelan Equine Encephalitis Virus* vaccinstam TC-83

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een verzoek van Intervet International B.V. om de pathogeniteitsklasse van TC-83, de levend verzwakte vaccinstam van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), te bepalen (IG 17-018\_2.8-000) deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) vaccinstam TC-83 en plaatsing op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.

VEEV is pathogeen voor paarden en kan ook bij de mens ziekte veroorzaken. Het virus komt voor in Noord-, Midden- en Zuid-Amerika en wordt hoofdzakelijk verspreid via muggen. Zowel het virus als de muggensoorten komen niet voor in Nederland.

TC-83 is een levend verzwakte vaccinstam van VEEV en bevat 11 mutaties ten opzichte van het wild-type virus, waarvan 2 mutaties verantwoordelijk zijn voor de verzwakking ervan. TC-83 is momenteel het enige werkzame vaccin dat toegelaten is voor vaccinatie van paarden. Ook mensen zijn in het verleden gevaccineerd met TC-83 als zij de kans liepen om in aanraking te komen met VEEV tijdens veld- of laboratoriumwerkzaamheden. Het vaccin wordt over het algemeen goed verdragen, maar kan wel lichte tot matige griepachtige symptomen geven. Voor zover bij de COGEM bekend is er geen melding gemaakt dat vaccinatie van TC-83 leidt tot de ontwikkeling van ernstige symptomen bij mens en dier, noch dat na vaccinatie reversie zou kunnen optreden van TC-83 naar een virulente variant van het virus.

Op basis van bovengenoemde afwegingen is de COGEM van oordeel dat VEEV vaccinstam TC-83 ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kan worden op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.



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 belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. T. Boekhout niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# **Pathogeniteitsclassificatie van *Venezuelan equine encephalitis virus* vaccinstam TC-83**

## **COGEM advies CGM/170328-05**

### **1. Inleiding**

Naar aanleiding van een verzoek van Intervet International B.V. (IG 17-018) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van TC-83, een levend verzwakte vaccinstam van *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). De aanvrager verzoekt om VEEV TC-83 op pathogeniteitsklasse 2 in te delen en te plaatsen op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.

### **2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

### **3. *Venezuelan equine encephalitis virus***

VEEV behoort binnen de familie *Togaviridae* tot het genus *Alphavirus*.<sup>1,2</sup> Het virus werd in 1938 voor het eerst geïsoleerd uit de hersenen van zieke paarden in de deelstaat Yaracuy in Venezuela (Zuid-Amerika). Later werd het virus ook aangetroffen in de tropische en subtropische regio's van Noord- en Centraal-Amerika.<sup>3</sup>

VEEV is onderdeel van het zogenoemde VEE complex. Dit complex bestaat uit zeven verschillende virussoorten en veertien verschillende subtypen.<sup>3</sup> VEEV behoort tot subtype 1 en wordt op basis van serologie verder onderverdeeld in epizoötische (IAB en IC) en enzoötische stammen (ID, IE en IF).<sup>4</sup> De epizoötische stammen zijn zeer pathogeen voor paarden, muil dieren, ezels en zebra's. De ziekteverschijnselen variëren van koorts tot ernstige hersenontsteking (encefalitis). VEEV kan ook een ziekte veroorzaken bij de mens. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot encefalitis.<sup>4,5</sup> De incidentie van encefalitis is minder dan vijf procent en de mortaliteit minder dan één procent.<sup>1</sup> Kinderen die herstellen van encefalitis kunnen hier neurologische stoornissen aan overhouden. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.<sup>4</sup>

VEEV wordt hoofdzakelijk door de muggensoorten *Culex melanoconion* spp. verspreid.<sup>1</sup> Daarnaast zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aerogene verspreiding heeft plaatsgevonden.<sup>6</sup> Het is onduidelijk in hoeverre aerogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt.

VEEV heeft een positief, enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 11,4 kilobasen.<sup>2,6</sup> Het genoom codeert voor zeven eiwitten, waarvan vier niet-structurele en drie structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen in de 5' regio. In de 3' regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2). Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd packagingsignaal dat noodzakelijk is om het genomisch RNA (gRNA) in te pakken in een eiwitmantel. De eiwitmantel wordt gevormd door het capsid-eiwit (C) en wordt op zijn beurt omgeven door een lipidenmembraan. Dit membraan bevat twee glycoproteïnes (E1 en E2), die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheer cel. De glycoproteïnes zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.<sup>2</sup>

### **4. VEEV vaccinstam TC-83**

Er is op dit moment één levend verzwakt VEEV vaccin beschikbaar, genaamd TC-83, dat toegelaten is als veterinair vaccin door de Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA).<sup>7</sup> Deze vaccinstam wordt ook onder een Investigational New Drug protocol van de FDA ook toegediend aan laboratorium- en veldmedewerkers die het risico lopen om geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV.<sup>8</sup> Beschreven is dat tot 1977 TC-83 is gebruikt om meer dan 5000 mensen te vaccineren.<sup>9</sup>

Het vaccin is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. Als gevolg is het virus op 11 plaatsen gemuteerd in het virale genoom, wat gezorgd heeft voor attenuatie van deze VEEV stam.<sup>10,11</sup> De verzwakking van het gemuteerde virus berust op 2 van deze 11 mutaties, namelijk nucleotide positie 3 in de 5' non-coding regio en de mutatie van een nucleotide dat resulteert in de verandering van het aminozuur threonine naar arginine op positie 120, gelegen in structureel eiwit E2.<sup>11</sup>

## 5. Eerder COGEM advies

Er is niet eerder door de COGEM geadviseerd over VEEV vaccinstam TC-83. Wel heeft de COGEM verscheidene malen geadviseerd over het gebruik van, en inschaling van werkzaamheden met VEEV RNA-replicons. Deze replicons waren gebaseerd op de VEEV vaccinstam TC-83, waarvan uit het genoom de structurele genen verwijderd waren.<sup>12,13</sup>

Het wild-type VEEV is in de Regeling ggo ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3.<sup>14</sup> De VEEV TC-83 vaccinstam is niet geclassificeerd. Volgens het Centers of Disease Control kunnen werkzaamheden met de vaccinstam TC-83 uitgevoerd worden op BSL-2 veiligheidsniveau.<sup>15</sup>

## 6. Overweging

In muizen is aangetoond dat inoculatie met wild-type VEEV lethaal was, terwijl na toediening van TC-83 alle muizen overleefden. Dit wijst erop dat TC-83 verminderd pathogeen is ten opzichte van wild-type VEEV.<sup>11</sup> Deze vaccinstam biedt een goede bescherming tegen een VEEV infectie in zowel mensen als paarden, door de vorming van neutraliserende antilichamen tegen TC-83 na vaccinatie.<sup>9,16</sup> TC-83 vaccinstam wordt gebruikt om laboratorium- en veldmedewerkers in Midden-Amerika en de Verenigde Staten in te enten, die het risico lopen om geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV. Daarnaast wordt militair personeel in de Verenigde Staten preventief ingeënt met geïnactiveerd TC-83 als onderdeel van een gezondheidsbeschermingsprogramma.<sup>7,9</sup> Wel zijn als bijwerking, lichte tot matige griepachtige symptomen beschreven.<sup>17</sup> Op dit moment wordt het 'levende' TC-83 vaccin alleen in Mexico en Colombia nog gebruikt voor de inenting van paarden. In de Verenigde Staten wordt het in geïnactiveerde vorm verkocht.<sup>6</sup>

De attenuatie van TC-83 berust op 2 van deze 11 mutaties. Theoretisch zou dit betekenen dat (terug)mutatie van deze twee posities al voldoende zou kunnen zijn voor het optreden van reversie van TC-83 richting een variant van het virus met de virulentie van wild-type VEEV (of een variant die een dergelijke virulentie benadert). In een studie met hamsters bleek dat TC-83 een leeftijdsafhankelijk effect had. Inoculatie van TC-83 bij jonge hamsters (4-5 weken oud) kon lethaal zijn, terwijl geïnoculeerde oudere hamsters (ouder dan 5 weken) niet stierven. Wel bleek dat virusisolaten van TC-83 geïsoleerd uit hersenen van jonge, dode hamsters een hogere virulentie hadden dan het TC-83 uitgangsvirus bij toediening aan oudere hamsters. Er is echter niet onderzocht of er genetische verschillen ten grondslag lagen aan de hogere virulentie na toediening van deze virusisolaten, dus het is onduidelijk of er sprake was van reversie van TC-83 naar een virulente variant van het virus *in vivo*.<sup>18</sup>

TC-83 is jarenlang gebruikt voor de vaccinatie van mensen en paarden. Er is in die periode geen melding gemaakt van ernstige ziekte, of dat reversie van het virus was opgetreden. De COGEM acht daarom het ontstaan en de verspreiding van virulentere virusvarianten van TC-83 door reversie, verwaarloosbaar klein.

## 7. Advies

### 7.1 Pathogeniteitsclassificatie van VEEV vaccinstam TC-83

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van oordeel dat VEEV vaccinstam TC-83 minder pathogeen is voor mens en dier dan wild-type VEEV. Zij komt tot dit oordeel omdat met deze vaccinstam mensen en paarden gevaccineerd zijn zonder dat dit leidde tot de ontwikkeling van ernstige symptomen. Er is tot op heden geen melding geweest dat na vaccinatie van TC-83 reversie naar een virulente variant van het virus heeft plaatsgevonden. Derhalve is de COGEM van oordeel dat VEEV vaccinstam TC-83 ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kan worden op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.

### 7.2 Inschaling van werkzaamheden met VEEV vaccinstam TC-83

Gebaseerd op de indeling van VEEV vaccinstam TC-83 in pathogeniteitsklasse 2 en conform de Regeling ggo adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met animale cellijnen, cellen en weefsels op ML-II niveau in te schalen. Hierbij stelt de COGEM als aanvullend voorschrift dat open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd moeten worden, en dat het dragen van handschoenen verplicht is, conform handelingen met andere alphavirussen, zoals *O'nyong-nyong virus* en *Ross River virus*.<sup>19</sup>

## Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. Powers A *et al.* (2012). Family *Togaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Weaver SC *et al.* (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 141-174
4. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
5. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
6. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
7. Guerbois *et al.* (2013). IRES-driven expression of the capsid protein of the Venezuelan equine encephalitis virus TC-83 vaccine strain increases its attenuation and safety *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9; 7: e2197
8. Grabenstein JD *et al.* (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol. Rev.* 28: 3-26

9. Burke DS et al., (1977). Persistence in humans of antibody to subtypes of Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) Virus after immunization with attenuated (TC-83) VEE Virus Vaccine. *J. Infect. Dis.* 136: 354-359
10. Kinney RM et al., (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
11. Kinney RM et al., (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
12. COGEM (2016). Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met replicons afgeleid van *Venezuelan equine encephalitis virus*. COGEM advies CGM/160815-01
13. COGEM (2016). Onderbouwing van omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-VEEV replicons. COGEM advies CGM/160906-02
14. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02
15. Centers of Disease Control (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Section: Eastern Equine Encephalitis (EEE) Virus, Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) Virus, and Western Equine Encephalitis (WEE) Virus. Pages 242-244.  
[www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf) (bezocht: 21 maart 2017)
16. Walton TE *et al.* (1972). Epizootic Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America. Disease pattern and vaccine evaluation in Nicaragua, 1969-1970. *Am. J. Epidemiol.* 95: 247-254
17. Alevizatos AC *et al.* (1967). Live, attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. I. Clinical effects in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 762-768
18. Jahrling PB & Scherer WF (1973). Homegeneity of Venezuelan encephalitis virion populations of hamster-virulent and benign strains, including the attenuated TC83 vaccine. *Infect. Immun.* 7: 905-910
19. COGEM (2010). Classificatie van vijf alphavirussen. COGEM advies CGM/101028-04