

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 26 november 2008
KENMERK CGM/081126-01
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met het Blauwtongvirus

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de adviesvraag over de vergunningaanvraag getiteld “Ontwikkeling van een levend, niet-spreidend vaccin voor Blauwtong” van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Blauwtongvirus (BTV). De aanvrager is voornemens om een levend vaccin tegen BTV serotype 8 te ontwikkelen. Tevens wil hij het virus zodanig wijzigen dat het niet meer van dier tot dier kan worden overgedragen via zijn gebruikelijke vector, de knut (*Culicoides sp.*). De aanvrager verzoekt om laboratoriumwerkzaamheden en dierexperimenteel onderzoek uit te voeren op inperkingsniveau ML-III, dan wel DM-III, binnen de zogenaamde High Containment Unit (HCU).

BTV is een dierpathogeen; de wetenschappelijke literatuur maakt geen melding van infecties bij de mens. De COGEM is van mening dat de voorgenomen genetische modificatie van BTV niet zal leiden tot een grotere pathogeniteit en gastheerbereik.

De inrichting van laboratoria en diervverblijven moet voldoen aan een aantal voorschriften welke beschreven zijn in de Regeling GGO. De ML-III ruimte van de HCU wijkt hiervan op enkele punten af. Zo is er bijvoorbeeld geen sluis bij de ingang van de ruimte, maar bevindt deze zich op de overgang tussen het gehele onderdrukgebied van de HCU (waar zich meerdere laboratoria bevinden) en de buitenwereld. Dit kan potentieel leiden tot besmetting van andere medewerkers in de HCU. Omdat in de HCU alleen gewerkt wordt met dierpathogenen, is de bescherming van medewerkers in dit geval echter niet in het geding. De COGEM is van mening dat de inrichting van de ruimte voldoende bescherming biedt tegen verspreiding van het gg-virus in het milieu.

Gezien het bovenstaande, is de COGEM van mening dat de werkzaamheden met gg-BTV, zoals voorgesteld door de aanvrager, kunnen plaatsvinden in de HCU op niveau ML-III en DM-III zonder risico's voor mens en milieu.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in dark ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small dash.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met het Blauwtongvirus

COGEM advies CGM/081126-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Blauwtongvirus (BTV) van het Centraal Veterinair Instituut te Lelystad. De aanvrager is voornemens om een levend, verzwakt genetisch gemodificeerd (gg-) vaccin op basis van BTV serotype 8 (BTV-8) te ontwikkelen.

De aanvrager beoogt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-III en DM-III in de zogenaamde High Containment Unit (HCU). Aangezien de inrichting van de ML-III ruimte enigszins afwijkt van de inrichtingsvoorschriften zoals beschreven in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling GGO), is de COGEM om advies gevraagd.

Blauwtongvirus

Blauwtong is een virusziekte van herkauwers. Met name schapen zijn vatbaar voor het virus, maar ook runderen, geiten of herten kunnen gastheer zijn. Bij schapen veroorzaakt het virus koorts, ontstekingen, schuimig speeksel, een opgezwollen blauwe tong en andere zwellingen (van vooral monddelen). Blauwtong kan leiden tot hoge sterfte onder schapen. De incubatieduur bij schapen is vijf tot twintig dagen. Infecties bij runderen zijn meestal symptomeloos. Zij fungeren echter als virusreservoir van waaruit het virus zich verder kan verspreiden. Runderen kunnen het virus tot honderd dagen bij zich dragen (1).

De vector

Het virus wordt verspreid door knutten (*Culicoides* species). Van de 1.400 bekende knutten-soorten is van minder dan 1% bekend dat ze BTV kunnen overdragen (1). *Culicoides imicola* wordt geacht de belangrijkste vector van BTV te zijn. Hoewel knutten geen grote afstanden vliegend kunnen afleggen, kunnen de insecten wel op passieve wijze over grote afstanden met de wind meegevoerd worden. Gerapporteerd is dat op deze wijze virusdragende knutten besmettingen hebben veroorzaakt op 20 en 300 kilometer van de oorspronkelijke besmettingshaard (1).

Knutten komen ook in Nederland voor, maar tot voor kort was onbekend of de Nederlandse (sub)species het virus konden overdragen. Inmiddels heeft onderzoek uitgewezen dat in Nederland gevangen knutten van de soort *C. dewulfi* het virus bij zich dragen (2). Dit maakt het aannemelijk dat deze soort betrokken is bij de verspreiding van

BTV in Nederland. Verder is een mix van de gevangen soorten *C. obsoletus* en *C. scoticus* (deze soorten zijn moeilijk te onderscheiden van elkaar) onderzocht op aanwezigheid van BTV-8 (2). Ook deze soorten blijken drager te zijn geweest van het virus tijdens de uitbraak van 2006. Het is echter niet duidelijk of één van beide soorten drager is of dat beide soorten dit zijn (2). Ten slotte blijkt dat ook *C. chiopterus* kan optreden als potentiële vector van BTV-8 (3).

Overigens wordt gedacht dat niet alleen knutten het virus kunnen overdragen, maar dat het virus ook via de placenta van moeder op kalf kan overgaan (4). Bovendien zouden kalveren het virus kunnen binnenkrijgen door het drinken van moedermelk de eerste dagen na het kalven (4).

Incidentie

BTV kent 24 verschillende serotypen die hoofdzakelijk voorkomen in landen rond de evenaar, waaronder Afrika, Zuid-Azië en Noord- en Zuid-Amerika. Vroeger kwam BTV incidenteel voor in Spanje of Portugal. In 1998 werd blauwtong voor het eerst vastgesteld op de Griekse eilanden. Sindsdien heeft de ziekte zich verspreid naar de Balkan, Zuid-Italië, Corsica en Zuidwest-Spanje.

In 2006 werd blauwtong voor het eerst in Nederland vastgesteld op een schapenhouderij in Zuid-Limburg (5). Het virus verspreidde zich snel en binnen een paar maanden werd blauwtong aangetoond bij enkele duizenden bedrijven, zowel schapenhouderijen als runderbedrijven, in Nederland, België, Duitsland en Noord-Frankrijk (6). Hoewel gehoopt werd dat het virus de winter niet zou overleven, brak blauwtong in juli 2007 opnieuw in alle hevigheid uit. De ziekte verspreidde zich sneller dan in 2006, de symptomen bij de geïnfecteerde dieren waren ernstiger en de mortaliteit was hoger (6).

De oorzaak van de uitbraken in 2006 en 2007 bleek BTV-8 te zijn (6). Dit serotype was tot dan toe slechts in Afrika, in gebieden ten zuiden van de Sahara, aangetoond. De uitbraak in 2007 vormde de aanleiding voor de overheid om een campagne te starten om op vrijwillige basis dieren te vaccineren tegen BTV-8.

Ook infecties met enkele andere serotypen kunnen voorkomen in Nederland. In het najaar van 2008 werd bij een aantal dieren in Nederland BTV serotype 6 aangetroffen (7). Dit virus bleek overeen te komen met een vaccinvirusstam die in Zuid-Afrika geproduceerd wordt (8). Dit vaccin bevat levend, verzwakt genetisch gemodificeerd BTV. Sommige vaccinvirussen kunnen nog van dier op dier worden overgedragen (8). Het vaccin bleek niet geregistreerd te zijn in Europa en mogelijk illegaal gebruikt in de omtrek van de getroffen bedrijven (8). En andere mogelijkheid is de import van gevaccineerde schapen.

Ten slotte is een derde BTV serotype in Nederland aangetroffen. De oorzaak was de import van met BTV-1 besmette runderen uit Frankrijk via België (9).

Eerder COGEM advies

Enkele jaren geleden heeft de COGEM criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen opgesteld (10). BTV werd destijds ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (10). Deze indeling was gebaseerd op de afwezigheid van de vector (knutten) in Nederland. Verspreiding van het virus kon daarom niet optreden.

Naar aanleiding van de blauwtonguitbraken in 2006 heeft de COGEM deze classificatie opnieuw onder de loep genomen (11). Inmiddels is bekend dat ook in Nederland voorkomende knutten waarschijnlijk betrokken zijn bij de verspreiding van BTV onder de veestapel. Gezien de aard van het virus, heeft de COGEM in 2006 geadviseerd om BTV in de schalen als een organisme van pathogeniteitsklasse 3 (11).

Adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met BTV-8. De aanvrager wil een gg-vaccin ontwikkelen op basis van dit virus. Bovendien wil hij, vanuit veiligheidsoverwegingen, het genetische materiaal van het virus dusdanig modificeren dat het zich niet meer kan verspreiden via knutten. Het betreft in elk geval wijzigingen aan het gen *VP7*, dat betrokken is bij de aanhechting van het virus aan insectencellen. De modificaties vinden op verschillende manieren plaats, waaronder via 'small interfering RNA' (siRNA) en/of het maken van reassortments.

De aanvrager wil de vervaardiging van het gg-vaccin uitvoeren op ML-III inperkingsniveau in de High Containment Unit (HCU).

Na de vervaardiging van het gg-vaccin wordt de werking ervan getest. Hiertoe wordt het middel toegediend aan dieren (schapen en runderen) waarna deze worden blootgesteld aan wildtype BTV-8. Tijdens het onderzoek wordt bloed afgenomen bij de dieren en na afloop ervan worden de dieren geëuthanaseerd. Mogelijk wordt sectie verricht om orgaanmateriaal te verkrijgen. Ook deze werkzaamheden wil de aanvrager binnen de HCU uitvoeren, op niveau DM-III.

Het bij dieren afgenomen lichaamsmateriaal wordt voor verder onderzoek (waaronder microscopie) vervoerd naar een ML-III laboratorium binnen de HCU.

Overweging en advies

Alvorens tot een advies te komen over de inschaling van werkzaamheden met het BTV-8 vaccin, wordt ingegaan op BTV, de werkzaamheden met het virus en de fysische inperking ervan tijdens de werkzaamheden.

BTV

Zoals eerder aangegeven is BTV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 (11). Bij de COGEM zijn geen gevallen van humane infecties met BTV bekend. Bronnen op internet maken melding van een laboratoriummedewerker die tijdens werkzaamheden met BTV geïnfecteerd geraakt is (12,13). Hierover is in de wetenschappelijke literatuur niets gepubliceerd, ondanks de wijde verspreiding van het virus in het milieu.

Op grond van de beschikbare wetenschappelijke gegevens zijn er geen redenen om aan te nemen dat BTV mensen kan infecteren. De COGEM acht daarom BTV alleen in staat om dieren te infecteren.

Werkzaamheden met BTV

De aanvrager wil een levend, verzwakt vaccin maken tegen BTV-8. Tevens wil hij het gastheerbereik van het gg-vaccin dusdanig veranderen dat deze niet meer in staat is de vector te infecteren. De COGEM ziet geen reden om aan te nemen dat deze werkzaamheden de pathogeniteit, transmissiewijze of het gastheerbereik van het virus vergroten. Over het algemeen zal inperking van het genoom van het virus leiden tot een verzwakt organisme.

Inperking van BTV

Om werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo) uit te mogen voeren, moeten laboratoriumruimtes en dierverblijven aan verschillende inrichtings- en werkvoorschriften voldoen. Dit betekent onder meer het nemen van maatregelen gericht tegen ontsnapping van het ggo vanuit het laboratorium in het milieu, zoals onderdruk en HEPA filters in de ontluchtingskanalen.

Welke maatregelen gehanteerd moeten worden, is afhankelijk van de aard van het organisme. In de Regeling ggo worden organismen op basis van hun pathogeniteit ingedeeld in klasse 1 (niet-pathogeen) tot klasse 4 (zeer pathogeen) (14). Aan elke klasse is een bepaald niveau van inperking en werkvoorschriften gekoppeld. Grofweg betekent dit dat ggo-werkzaamheden met een klasse 1 organisme kunnen plaatsvinden in een ML-I laboratorium terwijl werkzaamheden met een klasse 4 pathogeen in een ML-IV ruimte moeten plaatsvinden. Deze gehele systematiek is ontwikkeld voor pathogenen van de

mens. Zowel de indelingscriteria als de inrichtings- en werkvoorschriften zijn gericht op de bescherming van de mens.

Laboratoriumwerkzaamheden met een klasse 3 organismen, zoals BTV, dienen minimaal plaats te vinden op ML-III niveau. De inrichting van de ML-III ruimte binnen de HCU van de aanvrager verschilt op enkele punten van de inrichtings- en werkvoorschriften zoals beschreven in de Regeling GGO. Volgens deze Regeling zou bijvoorbeeld de werkruimte voorzien moeten zijn van een afsluitbare toegangsluis voorzien van twee deuren. De HCU beschikt echter over een toegangsluis op de grens tussen het gehele onderdrukgebied van de HCU (binnen dit gebied liggen meerdere laboratoria en werkruimtes) en de buitenwereld. Zodoende kunnen de in de HCU beroepsmatig aanwezige personen blootgesteld worden aan micro-organismen waarmee gewerkt wordt. Dit in tegenstelling tot werkzaamheden in een ML-III ruimte waarbinnen alleen de werkruimte valt en medewerkers in aangrenzende ruimtes beschermd worden tegen het pathogeen door de inperkingsmaatregelen van de ML-III ruimte. In de HCU wordt echter alleen gewerkt met dierpathogenen. Dit maakt dat de noodzaak van extra bescherming van de laboratoriummedewerker niet aan de orde is.

Gezien de aanwezigheid van onderdruk in de werkruimtes, de toegangsluis bij de ingang van de HCU en de overige inrichtings- en werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat de HCU voldoende bescherming biedt om verspreiding van BTV in het milieu buiten de HCU te voorkomen. Zij acht het nemen van aanvullende maatregelen niet noodzakelijk.

In juni 2006 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met het *Mond- en klauwzeer virus* (MKZV) in de HCU. MKZV is zeer infectieus en ingedeeld als een dierpathogeen van klasse 4. De COGEM heeft destijds geadviseerd dat het mogelijk is om laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerd MKZV op ML-III inperkingsniveau uit te voeren. Aangezien de mens als verspreider van het virus kan optreden, heeft de COGEM enkele aanvullende en gewijzigde voorschriften opgesteld om verspreiding via de medewerker te voorkomen (15).

Overigens is de aanvrager voornemens om dierexperimenteel onderzoek te verrichten op DM-III niveau. Deze werkruimte voldoet geheel aan de inrichtings- en werkvoorschriften zoals gesteld in de Regeling GGO. De COGEM is van mening dat werkzaamheden met BTV-8 onder deze condities uitgevoerd kunnen worden. Bovendien worden de dieren na afloop van het onderzoek geëuthanaseerd en afgevoerd ter destructie, waarna het afval geautoclaveerd wordt. Dit alles vindt plaats binnen de HCU.

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM het nemen van aanvullende voorschriften om verspreiding van BTV in het milieu, bijvoorbeeld via besmette dieren of afval, te voorkomen daarom niet van toepassing.

Conclusie

BTV is een klasse 3 pathogeen dat alleen voor dieren gevaarlijk is en niet voor de mens. De COGEM is van mening dat de werkzaamheden die de aanvrager wil uitvoeren de pathogeniteit, de transmissiewijze en/of het gastheerbereik niet zullen vergroten. Verder gelden in de HCU verschillende inrichtings- en werkvoorschriften welke voldoende fysieke inperking bieden om verspreiding van BTV in het milieu te voorkomen. Dit maakt dat de COGEM van mening is dat laboratoriumwerkzaamheden kunnen plaatsvinden op inperkingsniveau ML-III en dierexperimenteel onderzoek op niveau DM-III van de HCU. De COGEM acht het nemen van aanvullende voorschriften om verspreiding van het gg-vaccin in het milieu te voorkomen, hierbij niet noodzakelijk omdat de risico's voor mens en milieu bij de voorgestelde werkwijze verwaarloosbaar klein worden geacht.

Referenties

1. Purse BV, Mellor PS *et al.* (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature reviews microbiology* 3:171-181
2. Meiswinkel R, Baldet T *et al.* (2008). The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe – the entomological perspective. *Prev Vet Med* 87: 55-63
3. Dijkstra E, Van der Ven IJK, *et al.* (2008). *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europa. *Vet Rec* 162(13) 422
4. Centraal Veterinair Instituut (2008). Discussie over herkomst blautong laait op. Persbericht 10 juli 2008. Internet: www.cvi.wur.nl/NL/nieuwsagenda/nieuws-/Discussie_over_herkomst_blauwtong_laait_op.htm (19 november 2008)
5. Van Wuijckhuise L, Dercksen D, Muskens J, De Bruijn J, Scheepers M, Vrouwenraets R (2006). Bekende ziektebeelden maar toch net iets anders en op teveel bedrijven. *Tijdschrift voor de Diergeneeskunde* 131:649-654
6. Maan S, Maan NS *et al.* (2008). Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology* 377: 308-318
7. Ministerie van Landbouw (2008). Nieuw type blauwtong in Nederland aangetroffen. Persbericht 24 oktober 2008. Internet: www.minlnv.nl/portal/page?_pageid=116,1640333&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_news_item_id=23728 (18 november 2008)
8. Ministerie van Landbouw (2008). Blauwtong type 6 waarschijnlijk vaccinvirus. Persbericht 28 oktober 2008. Internet: http://www.minlnv.nl/portal/page?_pageid=116,-1640333&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_news_item_id=23734 (18 november 2009)

9. Ministerie van Landbouw (2008). Derde type blauwtong (type-1) in Nederland aangetroffen. Persbericht 7 november 2008). Internet: http://www.minlnv.nl/portal/page?_pageid=116,-1640333&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_news_item_id=23776 (18 november 2008)
10. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. Criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen (CGM/060420-04)
11. COGEM (2006). Classificatie van Bluetongue virus (CGM/061024-03)
12. American Veterinary Medical Association (2006). Bluetongue backgrounder. Internet: www.avma.org/reference/backgrounders/bluetongue_bgnd.asp (18 november 2008)
13. Iowa State University, Center for Food security & public health (2006). Internet: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf (18 november 2008)
14. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
15. COGEM (2006). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Mond-en-klauwzeervirus* (CGM/060711-01)