



## Empfehlung der ZKBS

### **zur Risikobewertung des Rift Valley fever virus (RVFV)-Isolats Clone 13 als Spender- oder Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Das *Rift Valley fever virus* (RVFV) gehört innerhalb der Familie der *Bunyaviridae* zum Genus *Phlebovirus* und ist gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die Risikogruppe 3 eingestuft, da es schwere Erkrankungen bei Wiederkäuern und beim Menschen hervorrufen kann.

Das Isolat Clone 13 wurde 1974 in der Zentralafrikanischen Republik aus einem Patienten mit Rift Valley-Fieber mit nicht-tödlichem Verlauf gewonnen [1]. In nachfolgenden Experimenten erwies sich Clone 13 als apathogen für Mäuse und Hamster. So zeigten die Tiere auch bei intraperitonealer Verabreichung einer Infektionsdosis von  $10^6$  plaque forming units (PFU) keine Anzeichen einer Erkrankung [1]. Hingegen ist bei Infektionen mit dem Wildtypstamm ZH548 bereits eine Infektionsdosis von 10 PFU letal [2]. Eine Analyse des Genoms von Clone 13 ergab, dass ca. 70 % des Gens für das Nichtstrukturprotein NSs *in frame* deletiert sind. Die Deletion führt zur Bildung eines verkürzten Proteins, welches nicht funktionsfähig ist und bereits kurz nach seiner Synthese vom Proteasom abgebaut wird.

Untersuchungen zur Funktion des Nichtstrukturproteins NSs ergaben, dass es sich um einen Virulenzfaktor handelt, welcher mit mehreren Zweigen der angeborenen Immunität interferiert. Zum einen unterdrückt NSs die Induktion der Typ I-Interferone IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  [3], vermutlich durch Inhibition des zellulären Transkriptionsfaktors TFIIH [4]. Zum anderen induziert NSs den proteasomalen Abbau der antiviral wirksamen Proteinkinase R (PKR). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NSs durch Interaktion mit pericentromeren DNA-Sequenzen zu Störungen in der mitotischen Chromosomentrennung führt [5] und somit möglicherweise für die bei RVFV-Infektionen häufig auftretenden Aborte und fötalen Missbildungen verantwortlich ist.

Die Attenuierung des  $\Delta$ NSs-Isolats Clone 13 wurde nicht nur in Mäusen und Hamstern, sondern auch in Ratten, Schafen (z. T. trächtig) und Kälbern nach subkutaner Infektion demonstriert [6-8]. Dabei zeigte keine der untersuchten Tierarten Anzeichen einer Erkrankung. Zudem kam es in den trächtigen Zibben weder zu Aborten noch zu fötalen Missbildungen [7]. Für immunkompetente Nager und Wiederkäuer ist Clone 13 bei subkutaner Infektion somit apathogen. Die intranasale Infektion von Mäusen mit einer höheren Dosis ( $\geq 2 \times 10^4$  tissue culture infective dose 50 [TCID<sub>50</sub>]) einer NSs-Deletionsmutante führte hingegen zu einer tödlich verlaufenden Meningoenzephalitis, was auf eine verzögerte humorale Immunantwort im Vergleich zur subkutanen Applikationsroute zurückgeführt wird [9]. Die subkutane Injektion von  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> in die Hinterpfote führte zu einer asymptomatischen Infektion. Auch bei Mäusen mit Immundefekten, wie z. B. einer Defizienz im IFN- $\alpha$ -Rezeptor, etabliert Clone 13 bereits bei Verabreichung einer äußerst geringen Virusmenge eine letale Infektion (LD<sub>50</sub>: 1 - 5 PFU; [3]). Die Infektion von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einer Dosis von  $10^5$  PFU führt ebenfalls zu einer letalen Erkrankung der Tiere; bei geringeren Infektionsdosen ist Clone 13 jedoch auch für PKR<sup>-/-</sup>-

Mäuse apathogen [10]. Aufgrund der gut belegten Sicherheit und Immunogenität ist Clone 13 seit kurzem in Südafrika als Veterinärimpfstoff zugelassen [11]. Zudem empfiehlt auch die *Rift Valley Fever Countermeasures Working Group* des *United States Department of Agriculture* in einem 2006 erschienenen Report für den Fall eines RVFV-Ausbruchs die Bevorratung mit Clone 13 als Notfallvakzine für gefährdete Nutztiere.

RVFV gehört zu den Arboviren, wobei die Übertragung von Tier zu Tier durch Stechmücken erfolgt (vor allem durch Vertreter der Gattungen *Culex* und *Aedes*). Bei der Übertragung auf den Menschen spielt zudem der direkte Kontakt mit infizierten Tieren eine wichtige Rolle (z. B. bei der Schlachtung oder beim Kontakt mit Aborten infizierter Tiere). Transmissionsstudien mit Clone 13 in Stechmücken ergaben, dass der Übertragungsweg des Virus von der Deletion im NSs-Gen unbeeinflusst bleibt. So repliziert Clone 13 sowohl in kultivierten Insektenzellen als auch in Stechmücken effizient und kann zudem von infizierten Mücken auf Hamster übertragen werden [12; 1]. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sich Clone 13 über Stechmücken innerhalb einer Tierpopulation ausbreiten könnte, da das Virus (mit Ausnahme von Hamstern) in den untersuchten Tierarten nicht virämisch vorliegt und somit von den Stechmücken auch nicht mit der Blutmahlzeit aufgenommen und übertragen werden kann.

Ein bislang wenig untersuchter Aspekt ist das Gefährdungspotenzial von Clone 13 für den Menschen. Es wäre jedoch denkbar, dass Clone 13 auch im Menschen einen attenuierten Phänotyp aufweist, da die Replikationseffizienz in humanen Fibroblasten im Vergleich zu IFN- $\alpha/\beta$ -defizienten Vero-Zellen um ca. drei Größenordnungen reduziert ist [1]. Clone 13 wurde zudem zwar aus einem Patienten isoliert, der am Rift Valley-Fieber erkrankt war; bei dem gesamten Isolat handelte es sich jedoch um ein heterogenes RVFV-Gemisch, aus dem insgesamt 17 Klone durch *plaque purification* isoliert wurden. Die oben beschriebene Deletion im Virulenzgen NSs wurde dabei lediglich bei Clone 13 festgestellt. Ein direkter Rückschluss auf die Pathogenität von Clone 13 für den Menschen ist zwar nicht möglich. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Erkrankung des Patienten auf die Anwesenheit der 16 anderen Klone, welche keine Deletion im NSs-Gen aufweisen, zurückzuführen ist, da Clone 13 in den *in vitro*-Untersuchungen eine deutlich verringerte Replikationsrate in humanen Fibroblasten im Vergleich zum Gesamtisolat sowie zu einem RVFV-Wildtypstamm zeigte [1].

## Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird das *Rift Valley fever virus* (RVFV)-Isolat Clone 13 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Zusätzlich zu den Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 empfiehlt die ZKBS bei gentechnischen Arbeiten mit Clone 13 das Tragen eines Mund- und Nasenschutzes als Berührungsschutz zur Vermeidung einer akzidentellen intranasalen Infektion.

## Begründung

Das *Rift Valley fever virus* (RVFV)-Isolat Clone 13 ist bei subkutaner oder intraperitonealer Infektion apathogen für immunkompetente Nager und Wiederkäuer. Die intranasale Infektion von immunkompetenten Mäusen mit einer hohen Dosis einer NSs-Deletionsmutante führte hingegen zu einer letalen Erkrankung der Tiere. Bislang ist nicht bekannt, ob Clone 13 im Menschen bei einer Infektion über den natürlichen Übertragungsweg ebenfalls keine Erkrankung auslöst. Es ist jedoch zu erwarten, dass Clone 13 beim Menschen zumindest einen attenuierten Phänotyp aufweist. Da aber nicht auszuschließen ist, dass akzidentelle intranasale Infektionen auch beim Menschen einen schwereren Krankheitsverlauf nehmen, ist bei gentechnischen Arbeiten mit dem Virus ein Mund- und Nasenschutz als Berührungsschutz zu tragen, um eine Einbringung von virushaltigem Material in die Nase zu vermeiden. Eine Übertragung von Clone 13 durch Stechmücken ist unwahrscheinlich, da das Virus in den meisten untersuchten Tierarten nicht mehr virämisch vorliegt.

## Literatur

1. Muller, R., Saluzzo, J., Lopez, N., Dreier, T., Turell, M., Smith, J., and Bouloy, M. (1995). Characterization of Clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg* **53**:405-411.
2. Vialat, P., Billecocq, A., Kohl, A., and Bouloy, M. (2000). The S segment of Rift Valley fever Phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *J Virol* **74**:1538-1543.
3. Bouloy, M., Janzen, C., Vialat, P., Khun, H., Pavlovic, J., Huerre, M., and Haller, O. (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of Rift Valley fever virus non-structural protein NSs. *J Virol* **75**:1371-1377.
4. Le May, N., Dubaele, S., De Santis, L.P., Billecocq, A., Bouloy, M., and Egly, J.M. (2004). TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell* **116**:541-550.
5. Mansuroglu, Z., Josse, T., Gilleron, J., Billecocq, A., Leger, P., Bouloy, M., and Bonnefoy, E. (2010). Nonstructural protein NSs of Rift Valley fever virus interacts with pericentromeric DNA sequences of the host cell, inducing chromosome cohesion and segregation defects. *J Virol* **84**:928-939.
6. Bird, B.H., Albarino, C.G., Hartman, A.L., Erickson, B.R., Ksiazek, T.G., and Nichol, S.T. (2008). Rift Valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge and allows for differential identification of infected and vaccinated animals. *J Virol* **82**:2681-2691.
7. Dungu, B., Louw, I., Lubisi, A., Hunter, P., von Teichmann, B.F., and Bouloy, M. (2010). Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine* **28**:4581-4587.
8. von Teichman, B., Engelbrecht, A., Zulu, G., Dungu, B., Pardini, A., and Bouloy, M. (2011). Safety and efficacy of the Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves. *Vaccine* **29**:5771-5777.
9. Dodd, K.A., McElroy, A.K., Jones, T.L., Zaki, S.R., Nichol, S.T., and Spiropoulou, C.F. (2014). Rift Valley fever virus encephalitis is associated with an ineffective systemic immune response and activated T cell infiltration into the CNS in an immunocompetent mouse model. *PLoS Negl Trop Dis* **8**:e2874.
10. Habjan, M., Pichlmair, A., Elliott, R.M., Överby, A.K., Glatter, T., Gstaiger, M., Superti-Furga, G., Unger, H., and Weber, F. (2009). NSs protein of Rift Valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* **83**:4365-4375.
11. <http://www.fao.org/docrep/014/i2310e/i2310e00.pdf>
12. Moutailler, S., Krida, G., Madec, Y., Bouloy, M., and Failloux, A. (2010). Replication of Clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, in *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis* **10**: 681-688.