

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

DATUM 24 augustus 2017
KENMERK CGM/170824-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met (genetisch gemodificeerd) *Murid gammaherpesvirus 4*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een verzoek van het Leids Universitair Medisch Centrum (IG 17-152_2.8-000) om de pathogeniteitsklasse van het *Murid gammaherpesvirus 4* te bepalen, en werkzaamheden met recombinanten van dit virus in te schalen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Murid gammaherpesvirus 4* (MuHV 4) en de inschaling van werkzaamheden met recombinanten van dit virus in experimenten met dierlijke cellen en met muizen.

MuHV 4 is een muizen gammaherpesvirus dat in bos- en veldmuizen wordt aangetroffen. Het virus infecteert in de acute fase van de infectie cellen in de luchtwegen, waarna het virus zich verspreidt naar lever, nieren en milt. Het virus blijft latent aanwezig in voornamelijk B-cellen in de milt, wat in ongeveer 10% van de geïnfecteerde muizen kan op lange termijn resulteren in het ontstaan van een B-cel lymfoom. Er zijn geen aanwijzingen dat het virus ziekte bij mensen kan veroorzaken.

Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat MuHV 4 pathogeen is voor mensen en zij beschouwt dit virus, dat in Nederland waarschijnlijk endemisch is in wilde muizen populaties, daarom als een strikt dierpathogeen. Zij adviseert om MuHV 4 in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen in Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo. Onder in achtneming van het bijbehorende inperkingsniveau II en met toepassing van een aantal aanvullende voorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met gg-MuHV 4 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

Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met (gg-)Murid gammaherpesvirus 4

COGEM advies CGM/170824-01

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van een verzoek van het Leids Universitair Medisch Centrum (IG 17-152) gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het *Murid gammaherpesvirus 4* (MuHV 4) en over plaatsing van dit virus op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo. Daarnaast is de COGEM gevraagd aan te geven of zij MuHV 4 als een strikt dierpathogeen virus beschouwt.

De aanvrager is voornemens om werkzaamheden met wildtype en recombinanten van MuHV 4 uit te voeren in dierlijke cellen, en in associatie met wildtype of genetisch gemodificeerde (gg)-muizen. De COGEM is tevens gevraagd om te adviseren over de inperkingsmaatregelen aangaande deze werkzaamheden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. Strikt dierpathogenen

Naast de pathogeniteitsklasse-indeling wordt bij de inschaling van ggo-werkzaamheden met virussen of virale sequenties in Bijlage 5 van de Regeling ggo ook onderscheid gemaakt tussen virussen die strikt dierpathogeen zijn, en virussen die pathogeen zijn voor mens en dier. In Bijlage 4 van de Regeling ggo is een lijst van virussen opgenomen met de pathogeniteitsklasse waarin zij ingedeeld zijn. Tevens wordt voor ieder van de virussen in deze Bijlage aangegeven of zij tot de groep van humaan- en dierpathogene virussen of de groep van strikt dierpathogene virussen worden gerekend.

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt: *Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.*

De overweging die de COGEM hanteert om dierpathogenen te classificeren wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.² De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

4. Murid gammaherpesvirus 4 (MuHV 4)

Murid gammaherpesvirus 4 (MuHV 4) is een dubbelstrengs DNA virus dat behoort tot het genus *Rhadinovirus* binnen de subfamilie *Gammaherpesvirinae* van de familie *Herpesviridae*. Het virus werd in de jaren 70 van de vorige eeuw voor het eerst aangetroffen in *Apodemus flavicollis* (grote bosmuizen) en *Myodes glareolus* (rosse woelmuizen) in verscheidene regio's in het huidige Slowakije. Daarnaast is MuHV 4 ook aangetroffen in Groot-Brittannië.^{3,4,5} Aangezien herpesvirussen gedurende miljoenen jaren co-evolutie hebben doorgemaakt met hun gastheer (muizen, mensen, olifanten, oesters, etc.) is het erg waarschijnlijk dat MuHV 4 ook aangetroffen wordt in (verwante) muizen soorten die voorkomen in andere gebieden, waaronder Nederland.^{5,6}

Er zijn verscheidene stammen van MuHV 4 geïdentificeerd: MHV-60, MHV-68, MHV-72, MHV-76, MHV-78, MHV-ŠUM, MHV-4556 en MHV-5682. MHV-68 is de meest gebruikte en bestudeerde stam. MHV-68 bevat 82 open reading frames (ORFs), waarvan de functie van 48 in kaart is gebracht. De ORFs kunnen in drie categorieën worden ingedeeld op basis van de aanwezigheid in andere herpesvirus subfamilies of soorten. Het betreft 1) ORFs die algemeen voorkomen in de gammaherpesvirus subfamilie, 2) ORFs die algemeen voorkomen in de totale herpesvirus familie en 3) ORFs die uniek zijn voor muizen herpesvirussen (genoemd: M1-M9, M10a,b,c en M11-14). Tussen de MuHV 4 stammen bestaat er variantie in de aanwezigheid van met name deze laatste categorie van ORFs. Stam MHV-76 mist onder andere de ORFs M1-M4, terwijl stam MHV-72 de ORFs M1-M3 ontbeert. Het is echter niet uitgesloten dat deze deleties spontaan zijn opgetreden door *in vitro* propagatie van de stammen.⁷

Hoewel de stammen op genomisch niveau van elkaar worden onderscheiden, veroorzaken ze na infectie in muizen een overeenkomstig ziekteverloop. Na intranasale toediening van MuHV 4 in muizen infecteert het virus in de acute fase van de infectie endotheel- en epitheliale cellen in de luchtwegen, waar vervolgens virusrePLICATIE plaatsvindt. Het virus verspreidt zich via de bloedsomloop naar lever, nieren en milt, waar het virus latent aanwezig blijft en kan reactiveren. MuHV 4 infecteert B-cellen in de milt, maar ook dendritische cellen en macrofagen kunnen geïnfecteerd worden. Splenomegalie is een veel voorkomend verschijnsel na infectie met MuHV 4. Gezonde muizen overleven over het algemeen een infectie met MuHV 4, maar het virus kan lethaal zijn als gevolg van longproblemen voor muizen met een verzwakt immuunsysteem. De latente fase van de infectie met MuHV 4 is geassocieerd met de ontwikkeling van een lymfoproliferatieve aandoening in de vorm van een B-cel lymfoom in ongeveer 10% van de geïnfecteerde muizen. Het ziektebeeld na MuHV 4 infectie vertoont grote gelijkens met het ziektebeeld na infectie met Epstein Barr virus (EBV; *Human gammaherpesvirus 4*) dat in mensen de Ziekte van Pfeiffer veroorzaakt, en Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV; *Human gammaherpesvirus 8*). MuHV 4 is daarom geschikt om in *in vivo* modellen de pathogenese van deze humane gammaherpesvirussen te bestuderen.^{5,7}

5. Eerder COGEM advies en classificaties van andere beoordelende instanties

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de classificatie van MuHV 4. Wel heeft zij eerder een drietal virussen behorende tot het genus *Rhadinovirus* geïdentificeerd en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Het betrof het *Saimiriine gammaherpesvirus 2* en het *Human gammaherpesvirus 8*, alsmede het strikt dierpathogene *Bovine gammaherpesvirus*.^{8,9}

De 'American Type Culture Collection' (ATCC) heeft werkzaamheden met MuHV 4 ingeschaald op BSL-2.¹⁰ Het Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA) heeft werkzaamheden met MuHV 4 ingeschaald in risicogroep 2.¹¹ De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

6. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens werkzaamheden uit te voeren met de MHV-68 stam van MuHV 4. Het betreft werkzaamheden met zowel wildtype MHV-68 als twee recombinanten van MHV-68. Bij deze

twee MHV-68 recombinanten is in de 'intergenic region' tussen de ORF 27 en ORF 29b een expressiecassette gekloneerd.^{12,13} Recombinant MHV-68-YFP bevat een expressiecassette waarin vanaf een Cytomegalovirus (CMV)-gedreven promotor, yellow-fluorescent protein (YFP) tot expressie komt in het virus. Recombinant MHV-68-H2b-YFP bevat een expressiecassette waardoor een fusie-eiwit van YFP en (muis) histon h2b tot expressie komt. Door de expressie van YFP enerzijds of h2b-YFP anderzijds is het mogelijk om cellen te detecteren die met MHV-68 geïnfecteerd zijn. De aanvrager is van plan zowel dierlijke cellen als wildtype en gg-muizen met MHV-68, MHV-68-YFP en MHV-68-H2b-YFP te infecteren. Tevens wil de aanvrager werkzaamheden uitvoeren met biologisch materiaal afkomstig van de geïnfecteerde muizen.

7. Overweging en advies

7.1 Classificatie MuHV 4

Infectie met MuHV 4 leidt over het algemeen niet tot ernstige ziekte in muizen, hoewel op lange termijn (in de latente fase van de infectie) in ongeveer 10% van de onder laboratoriumcondities gehouden muizen een B-cel lymfoom gevormd wordt.

Transmissie van MuHV 4 kan zowel horizontaal (tussen twee individuen via de lucht, speeksel of urine) als verticaal (moeder op kind via placenta of borstvoeding) plaatsvinden tussen muizen. Antistoffen tegen het virus zijn ook in wilde dieren aangetroffen, waaronder herten, zwijnen, vossen, fazanten en teken, en in landbouwhuisdieren, zoals schapen, paarden, geiten, katten en honden. Door de grote mate van serologische kruisreactie tussen gammaherpesvirussen kan hier echter niet uit geconcludeerd worden dat MuHV 4 een breed gastheerbereik heeft. MuHV 4 is aangetroffen in teken en onder experimentele condities kan transmissie naar muizen via teken plaatsvinden. In de literatuur wordt geen melding gemaakt dat aanwezigheid van MuHV 4 ziekte veroorzaakte bij andere dieren dan muizen.¹⁴

Er is weinig informatie beschikbaar over de enzoötische verspreiding van het virus. MuHV 4 is naast Slowakije ook in Groot-Brittannië aangetroffen.^{3,4,5} Hoewel er geen data over de aanwezigheid van het virus in Nederland bekend is bij de COGEM, acht zij het aannemelijk dat het virus ook in Nederland van nature voorkomt.

Er is aangetoond dat MuHV 4 onder laboratoriumcondities humane cellijnen kan infecteren.¹⁵ Echter, voor zover bekend zijn er bij de COGEM geen eenduidige gegevens beschikbaar over infectie van mensen met MuHV 4. Daarnaast zijn er bij de COGEM geen studies bekend die melding maken dat MuHV 4 ziekte kan veroorzaken bij mensen. Er zijn een aantal studies uitgevoerd waarbij de aanwezigheid van MuHV 4-specifieke antilichamen in sera van mensen bepaald is. In één van deze studies werd de aanwezigheid van deze antilichamen gedetecteerd in een groep patiënten. Nadere evaluatie van deze observatie wees uit dat de gehanteerde detectiemethode voor het aantonen van MuHV 4-specifieke antilichamen niet voldeed en dat, als gevolg van cross-reactiviteit, ook EBV-specifieke antilichamen in het serum gedetecteerd konden worden. Ook in studies bij laboratoriumpersoneel dat het met virus gewerkt heeft en bij jagers die indirect contact hebben gehad met het virus in het wild, werden MuHV 4-specifieke antilichamen in serum aangetoond. Echter, ook in deze studiegroepen kon cross-

reactiviteit veroorzaakt door EBV-specifieke antilichamen in de sera van deze individuen niet worden uitgesloten. De COGEM acht het aannemelijk dat er inderdaad sprake was van vals-positieve resultaten, omdat het overgrote deel van de humane populatie geïnfecteerd is met EBV. Echter, zij kan op basis van deze bevindingen niet geheel uitsluiten dat MuHV 4 onder natuurlijke condities humane cellen kan infecteren.

Voor zover bekend bij de COGEM zijn er geen meldingen gemaakt dat MuHV 4 ziekte bij mensen veroorzaakt, zowel in de gebieden waar het virus met zekerheid wordt aangetroffen (Slowakije en Groot-Brittannië) als in andere gebieden waarvan het waarschijnlijk is dat het virus er ook voorkomt. Op basis van bovenstaande overwegingen beschouwt de COGEM MuHV 4 daarom als een strikdierpathogeen virus. Aangezien MuHV 4 bij muizen over het algemeen niet tot ernstige ziekte leidt, adviseert de COGEM om MuHV 4 in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en toe te voegen aan lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.

7.2 Inschaling van werkzaamheden met gg-MuHV 4

De aanvrager is voornemens om werkzaamheden te verrichten met de recombinanten MHV-68-YFP en MHV-68-H2b-YFP. Deze recombinanten zijn gehanteerd in een tweetal studies met muizen, waarin werd aangetoond dat replicatie van beide recombinanten in de acute fase van de infectie, alsmede reactivatie in de latente fase van de infectie, vergelijkbaar is met wildtype MHV-68.^{12,13} Op basis van deze bevindingen is de COGEM van oordeel dat er geen aanwijzingen zijn dat beide recombinanten van MHV-68 meer pathogeen zijn dan wildtype MHV-68. De COGEM adviseert daarom om werkzaamheden waarbij (gg-) muizen worden geïnfecteerd met recombinant MHV-68 uit te voeren op DM-II. Aangezien de COGEM de kans op aërogene verspreiding van MuHV 4 niet kan uitsluiten, adviseert zij, om in lijn met de inperkingsmaatregelen behorende op dit veiligheidsniveau, aanvullende voorschriften te hanteren die aërogene verspreiding van de virusdeeltjes tegengaan. Deze voorschriften betreffen het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden, het huisvesten van de dieren in filtertopkooien en het uitvoeren van open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet. Daarnaast adviseert de COGEM om werkzaamheden met biologisch materiaal afkomstig van de geïnfecteerde muizen, alsmede werkzaamheden met gg-MuHV 4 virusdeeltjes in associatie met dierlijke cellen voor productie en infectie, uit te voeren op ML-II. Eveneens adviseert zij om bij deze werkzaamheden het dragen van handschoenen en de uitvoering van open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet als aanvullende voorschriften te hanteren.

Referenties

1. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
2. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
3. Telfer S *et al.* (2007). The dynamics of murid gammaherpesvirus 4 within wild, sympatric populations of bank voles and wood mice. *J. Wildl. Dis.* 43: 32-39

4. Blasdell K *et al.* (2003). The wood mouse is a natural host for *Murid herpesvirus 4*. J. Gen. Virol. 84: 111-113
5. Nash AA *et al.* (2001). Natural history of murine γ -herpesvirus infection. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356: 569-579.
6. Roizman B & Pellett PE (2001). The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction. In: Fields virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. Mistroková J & Rajčáni J (2008). Comparison of pathogenic properties of the murid gammaherpesvirus (MuHV 4) strains: a role for immunomodulatory proteins encoded by the left (5'-)end of the genome. Cent. Eur. J. Biol. 3(1): 19-30
8. COGEM (2000). Pathogeniciteit van recombinant herpesvirus saimiri (rHVS) in cotton top tamarins. COGEM advies CGM/000202-01
9. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
10. American Type Culture Collection. Products. Murid herpesvirus 4. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/VR-1465.aspx> (bezocht: 17 augustus 2017)
11. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BAUA). Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe 462. <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html> (bezocht: 17 augustus 2017)
12. Collins CM *et al.* (2009). Identification of infected B-cell populations by using a recombinant murine gammaherpesvirus 68 expressing a fluorescent protein. J. Virol. 83: 6484-6493
13. Collins CM *et al.* (2012). Tracking murine gammaherpesvirus 68 infection of germinal center B cells *in vivo*. PLoS One. 7: e33230
14. Wágnerová M *et al.* (2015). Possible role of different animal species in maintenance and spread of murine gammaherpesvirus 68 in nature. Acta Virol. 59: 14-19
15. Svobodová J *et al.* (1982). Growth characteristics of herpesviruses isolated from free living small rodents. Acta Virol. 29: 312-317