

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 22 augustus 2013
KENMERK CGM/130822-01
ONDERWERP Advies: Inschaling werkzaamheden met gg-Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV)

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel 'MERS-CoV; evolutie, moleculaire biologie, pathogenese en reverse genetics' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus* (MERS-CoV). De aanvrager vraagt om een vergunning voor werkzaamheden met gekloneerd MERS-CoV (vervaardigd met recombinant DNA technieken) en met verschillende gg-MERS-CoV afgeleide mutanten.

MERS-CoV veroorzaakt een ernstige ziekte. Symptomen van deze ziekte zijn koorts, longontsteking, hoesten, kortademigheid en ademhalingsproblemen. Het virus kan zich verspreiden door hoesten en intensief contact. Er zijn geen vaccins of medicijnen tegen MERS-CoV beschikbaar. Quarantainemaatregelen lijken verspreiding van het virus te kunnen voorkomen. Op grond van het bovenstaande is de COGEM van mening dat het MERS-CoV beschouwd moet worden als een virus van pathogeniteitsklasse 3.

Gebaseerd op bovengenoemde classificatie adviseert de COGEM experimenten waarbij infectieus replicatiecompetent virus kan ontstaan in te delen op ML-III inperkingsniveau.

Transfectie-experimenten waaruit geen infectieus virus kan ontstaan met delen van het MERS-CoV genoom of met RNA replicons, adviseert de COGEM in te schalen op ML-II. De COGEM adviseert klonering van delen van het genoom van MERS-CoV, op ML-I inperkingsniveau in te schalen. De COGEM stemt in met de aanvrager om klonering van het hele virale genoom en mutanten daarvan op ML-II inperkingsniveau in te schalen.

Op genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's verbonden aan de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,



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

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met gg- *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*

COGEM advies CGM/130822-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse het *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus* (MERS-CoV) ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden, waaronder het ontwikkelen van een full-length cDNA kloon van MERS-CoV voor ‘reverse genetic’ studies. De aanvrager wil ondermeer onderzoek doen naar de structuur en functie van het replicatiecomplex van MERS-CoV, cellulaire factoren karakteriseren die betrokken zijn bij de replicatie en afweer tegen het virus, en onderzoek doen naar de virale functies die zorgen voor het ontwijken van de immuunrespons.

1.1 *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*

Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV) is ook bekend onder de naam human coronavirus EMC (hCoV-EMC) of novel coronavirus (nCoV). Het MERS-CoV is in de zomer van 2012 ontdekt bij een patiënt met acute longontsteking en nierfalen uit Saudi-Arabië.¹ Tot nu toe zijn er 94 mensen gediagnosticeerd met MERS-CoV. De meeste patiënten worden opgenomen met zeer ernstige acute luchtwegklachten en de mortaliteit is ongeveer 50%.² Symptomen zijn koorts, longontsteking, hoesten, kortademigheid en ademhalingsproblemen. Sommige patiënten hebben last van nierfalen en klachten m.b.t. het spijsverteringskanaal. (Chronisch) zieke mensen of mensen met een niet goed functionerend immuunsysteem lijken meer risico te lopen op een infectie met MERS-CoV. Maar recentelijk zijn er gediagnosticeerde personen beschreven die geen of milde symptomen hadden.³

Aangezien de clusters van infecties beperkt zijn gebleven tot individuen (medewerkers in ziekenhuizen en familieleden) die veelvuldig contact hadden met MERS-CoV geïnfecteerde patiënten, lijkt de transmissie van mens-op-mens niet efficiënt te verlopen.^{4,5} Er zijn geen vaccins of medicijnen tegen MERS-CoV beschikbaar.

Het MERS-CoV virus vertoont de meeste homologie met vleermuis coronavirussen. Het is tot nu toe niet bekend of MERS-CoV rechtstreeks van vleermuizen naar mensen wordt overgedragen of dat er een andere gastheer bij betrokken is. In een recente studie zijn antilichamen in dromedarissen aangetroffen tegen MERS-CoV of een vergelijkbaar coronavirus. Het MERS-CoV is tot nog toe alleen in mensen aangetoond.⁶

1.2 *Genomische organisatie van MERS-CoV*

Het MERS-CoV behoort tot de orde *Nidovirales*, de familie *Coronaviridae* en het genus *Betacoronavirus* (lineage C).⁷ Het genoom van MERS-CoV vertoont de meeste overeenkomst met dat van de vleermuis coronavirussen HKU4 en HKU5 (75-77% sequentie overeenkomst).⁸ Het virus is verwant aan *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV).⁹

MERS-CoV is een enkelstrengs (+) RNA virus met een genoom van ca. 30 kb groot. Analyse van de genoomsequentie wijst op de aanwezigheid van twee grote, gedeeltelijk overlappende open reading frames (ORFs) (ORF1a en ORF1b) en (minstens) 9 andere ORFs. Bioinformatische analyses voorspellen dat ORF1a en ORF1b eiwitten door proteasen worden geknipt in 16 niet-structurele eiwitten (nsp1 t/m nsp16). In verwante virussen zijn deze niet structurele eiwitten betrokken bij de replicatie van het virus en het ontwijken van de immuunrespons. ORF2, ORF6, ORF7 en ORF8a coderen voor de vier structurele eiwitten S (spike), E (envelope) en M (membrane) en het N eiwit (nucleocapsid). Het S eiwit is bepalend voor het tropisme van het virus. Aan de 5' en 3' uiteinden van het genoom van MERS-CoV bevinden zich niet-coderende sequenties, de zogenaamde 'non-translated regions' of NTRs die noodzakelijk zijn voor replicatie.

1.3 Classificatie

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Daartoe is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁰ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
 - het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
 - het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
 - 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;
 - van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

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

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

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

In Duitsland¹¹ en Canada¹² is het MERS-CoV geclassificeerd als pathogeniteitsklasse 3. De WHO¹³ en de CDC¹⁴ adviseren om werkzaamheden met MERS-CoV op BSL-3 uit te voeren met aanvullende maatregelen.

2. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan met behulp van ‘reverse genetics’ replicatiecompetente, defectieve MERS-CoV deeltjes (replicons) en replicatiecompetente infectieuze MERS-CoV virusdeeltjes te produceren. Daarnaast zullen verschillende afgeleide mutanten van MERS-CoV geproduceerd worden. Hierbij wordt door de aanvrager doelbewuste mutatie van het virale S eiwit uitgesloten om mogelijke verandering van gastheer en gastheercellen te voorkomen.

De aanvrager is voornemens mutaties dan wel deleties te introduceren in delen van het genoom die coderen voor RNA signalen, replicase functies, accessoire eiwitten en het N eiwit. Tevens zullen puntmutaties die geneesmiddelresistentie induceren geïntroduceerd worden. In deze fase zullen er geen *in vivo* experimenten uitgevoerd worden.

3. Adviesvraag

De COGEM is gevraagd in welke pathogeniteitsklasse MERS-CoV ingedeeld moet worden en te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden, daarnaast heeft het Bureau GGO een aantal aanvullende vragen gesteld:

- Kan de COGEM instemmen met de inschaling van de verschillende onderdelen en de daarbij opgestelde aanvullende voorschriften? Zo niet, welk inperkingsniveau of (additionele) aanvullende voorschriften acht zij noodzakelijk voor de voorgenomen werkzaamheden.
- Is de COGEM het eens met de onderbouwing van de aanvrager dat verhoging in pathogeniteit, virulentie en fitness van alle aangevraagde mutanten van MERS-CoV niet te verwachten is?
- Is de COGEM van mening dat het aanbrengen van mutaties die drug resistentie induceren in het genoom van replicon en full length MERS-CoV onder de voorgestelde inschaling kan plaatsvinden?
- Is de COGEM van mening dat door het deleteren van de genen coderend voor de structurele eiwitten M en E van MERS-CoV de productie van infectieuze virusdeeltjes voorkomen wordt?

4. Eerder COGEM advies

Werkzaamheden met MERS-CoV, gg-MERS-CoV of hiervan afgeleide replicons zijn nog niet eerder beoordeeld of vergund in Nederland. In 2003 heeft de COGEM wel geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van SARS-CoV. De COGEM concludeerde dat het SARS-CoV als een klasse 3 pathogeniteitsvirus beschouwd kan worden.¹⁵ Verder heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen die minder pathogeen zijn.¹⁶

5. Overweging en advies

5.1 Classificatie van MERS-CoV

MERS-CoV kan een ernstige ziekte veroorzaken, met een mortaliteit van ongeveer 50% van de gehospitaliseerde gevallen. Besmetting van mens-op-mens is mogelijk, maar is weinig efficiënt. Epidemiologische data verzameld in het afgelopen jaar tonen aan dat MERS-CoV zich alleen door intensief contact kan verspreiden.^{4,5} Quarantainemaatregelen lijken verspreiding van het virus te kunnen voorkomen. Op dit moment is er nog geen effectieve behandeling of vaccin beschikbaar.

Gezien de aard van de ziekte en de afwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling is, adviseert de COGEM MERS-CoV in pathogeniteitsklasse 3 in te delen.

5.2 Klonering van MERS-CoV sequenties in *E. coli*

De aanvrager is van plan drie verschillende soorten constructen te kloneren in *Escherichia coli*. Ten eerste wil de aanvrager het complete cDNA van MERS-CoV en hiervan afgeleide mutanten kloneren. Hierbij zullen geen mutaties in de structurele genen S, E of M aangebracht worden. Aangezien er geen virale transcriptie in *E. coli* plaats kan vinden en er grote verschillen zijn in translationele processing in een prokaryote en eukaryote cel acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er infectieus MERS-CoV geproduceerd wordt.¹⁷

De aanvrager stelt voor om de kloneringswerkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te voeren. Eerder heeft de COGEM geadviseerd, dat kloneringswerkzaamheden van virussen met een pathogeniteitsklasse 3 indeling op ML-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden, omdat er grote verschillen zijn tussen bacteriën en zoogdiercellen.¹⁷ Gezien dit advies heeft de COGEM geen bezwaar dat de kloneringswerkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd zullen worden.

Ten tweede zullen RNA sequenties van MERS-CoV, afzonderlijke virale genen van MERS-CoV of combinaties hiervan gekloneerd worden, waarbij niet tegelijk de 5' niet-coderende sequentie (5' NTR), het complete replicase gen (ORF1a/b) als de 3' NTR van MERS-CoV aanwezig zullen zijn. Als derde worden cDNA's van defectieve genomen (replicons) en afgeleiden hiervan gekloneerd in *E. coli*. In de replicons zullen de structurele genen voor M en E afwezig zijn.

De COGEM adviseert om klonering van delen van het MERS-CoV genoom conform de Regeling ggo in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

De aanvrager geeft aan tijdens deze werkzaamheden de volgende voorschriften te hanteren:

- de DNA fragmenten afkomstig van MERS-CoV worden gecontroleerd op grootte en restrictiepatroon alvorens gekloneerd te worden;
- mutanten van de genen coderend voor de structurele eiwitten S, E en M, zijn uitgesloten;
- bij kloneren van combinaties van niet-coderende RNA sequenties van MERS-CoV en afzonderlijke virale genen van MERS-CoV zijn combinaties die zowel de 5' NTR, het complete replicase gen (ORF1a/b) als de 3' NTR van MERS-CoV bevatten, op ML-I inperkingsniveau uitgesloten;
- voor de productie van replicons geldt dat de genen coderend voor de structurele eiwitten M en E van MERS-CoV zijn uitgesloten.

5.3 Transfectie van animale cellen met MERS-CoV sequenties en productie van infectieuze replicatiedefectieve MERS-CoV virusdeeltjes

De aanvrager is van plan animale cellen te transfecteren met RNA sequenties van MERS-CoV, afzonderlijke virale genen van MERS-CoV of combinaties hiervan. De aanvrager geeft aan geen mutaties in de structurele genen S, E en M te introduceren. Verder zal de aanvrager deze experimenten alleen uitvoeren in cellen die vrij zijn van coronavirussen om hiermee de kans op het ontstaan van infectieus replicatiecompetent virus door recombinatie te voorkomen.

Onder de gestelde voorwaarde dat de cellen vrij zijn van coronavirussen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat infectieus virus gevormd wordt. De COGEM adviseert deze transfectiesexperimenten met delen van het MERS-CoV genoom op ML-II inperkingsniveau in te schalen.

RNA replicons op basis van alphavirussen

De aanvrager wil RNA replicons produceren die gebaseerd zijn op defectieve genetisch gemodificeerde Semliki Forest virusvectoren en Sindbis virusvectoren (alphavirussen). De replicons bevatten niet-coderende RNA sequenties van MERS-CoV, afzonderlijke virale genen van MERS-CoV of combinaties hiervan. Aangezien er bij sommige combinaties replicatiecompetent virus zou kunnen ontstaan, zal de aanvrager niet tegelijkertijd de 5' NTR, het complete replicase gen (ORF1a/b) als de 3' NTR van MERS-CoV combineren. Tevens zullen er geen mutaties aangebracht worden in de structurele genen S, E en M. De structurele genen van de defectieve genetisch gemodificeerde Semliki Forest virus en Sindbis virusvectoren zijn verwijderd waardoor er geen virale vectordeeltjes geproduceerd kunnen worden. De aanvrager geeft aan dat de genen van MERS-CoV niet in staat zijn de afwezigheid van de structurele alphavirusgenen te complementeren. Door te voorkomen dat het complete MERS-CoV genoom aanwezig is, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat deze werkzaamheden leiden tot het ontstaan van replicatiecompetente of infectieuze replicatiedefectieve MERS-CoV of alphavirusvirusdeeltjes.

De COGEM adviseert de productie van alphavirusreplicons op ML-II inperkingsniveau in te schalen.

De aanvrager geeft aan tijdens deze werkzaamheden de volgende verdere voorschriften te hanteren:

Voor transfecties met vectoren die MERS-CoV sequenties bevatten geldt:

- het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van MERS-CoV en andere coronavirussen.

Productie van lentivirale deeltjes

De aanvrager wil lentivirale deeltjes produceren die cellulaire genen, niet-coderende RNA sequenties van MERS-CoV, afzonderlijke virale genen van MERS-CoV of combinaties van niet-coderende RNA sequenties en virale genen van MERS-CoV bevatten. De aanvrager geeft aan dat er geen combinaties gebruik zullen worden die aanleiding geven tot replicatiecompetent virus. Als er MERS-CoV constructen gebruikt worden die mutaties bevatten, zullen dit geen mutaties zijn in de structurele eiwitten S, E en M. Voor de productie gebruikt de aanvrager het 3^e generatie lentivirale

productiesysteem. Bij de productie van de lentivirale deeltjes wordt gebruik gemaakt van 4 verschillende plasmiden. De plasmiden bevatten elk een essentieel element voor de productie van lentivirale deeltjes, hierdoor zijn er minimaal 3 recombinaties noodzakelijk om replicatiecompetent virus te krijgen. Voor de productie van de lentivirale vectoren worden ‘zelf inactiverende’ SIN vectoren gebruikt. De aanvrager geeft aan dat transductie van cellen met replicatiedeficiënte MERS-CoV bevattende lentivirale deeltjes alleen plaats zal vinden in gastheercellen die vrij zijn van lentivirussen en coronavirussen, waardoor het risico is op recombinatie verwaarloosbaar klein is.

De COGEM van mening dat de kans op het ontstaan van replicatiecompetent MERS-CoV onder deze omstandigheden verwaarloosbaar klein is en adviseert de productie van lentivirale deeltjes op ML-II in te schalen.

De aanvrager geeft aan tijdens deze werkzaamheden de volgende voorschriften te hanteren:

Bij de productie van genetisch gemodificeerde lentivirale deeltjes en werkzaamheden hiermee:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd;
- het te gebruiken gastheer materiaal moet is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

Voor transductie met vectoren die MERS-CoV sequenties bevatten geldt tevens:

- het ontstaan van constructen die zowel de 5'-niet-coderende sequentie (5'-NTR), het complete replicase gen (ORF1a/b) als de 3'-niet-coderende sequentie van MERS-CoV bevat, wordt uitgesloten;
- het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van MERS-CoV en andere coronavirussen.

5.4 Omlaagschaling van getransduceerde cellen die cellulaire genen tot expressie brengen

De aanvrager geeft aan dat de transductie van animale cellen met lentivirale deeltjes die cellulaire genen bevatten, plaatsvindt in animale cellen die vrij zijn van lenti- of retrovirussen zodat er geen replicatiecompetent virus kan ontstaan. Verder geeft de aanvrager aan maatregelen te nemen om de bij de transductie geïntroduceerde vrije lentivirale deeltjes te verwijderen. De getransduceerde cellen zullen gecontroleerd worden op de aanwezigheid van lentivirale deeltjes voordat de cellen het ML-II inperkingsniveau verlaten.

De COGEM is van mening dat het risico op het ontstaan van replicatiecompetent virus bij deze maatregelen, gezien het feit dat het hier een 3^e generatie productiesysteem betreft, verwaarloosbaar klein is. De COGEM stemt in om de werkzaamheden met deze cellen uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.

De aanvrager geeft aan voor het omlaagschalen van werkzaamheden met lentivirale deeltjes die cellulaire genen bevatten de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd;
- het te gebruiken gastheer materiaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen;

- het is niet toegestaan handelingen met de lentiviraal getransduceerde animale cellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatie-competente lenti- of retrovirussen of andere vectorsystemen in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
- macrofaagachtige cellen, waaronder macrofagen, dendritische cellen en folliculaire dendritische cellen, worden na transductie met een gevalideerde methode getest op afwezigheid van vrije infectieuze virusdeeltjes;
- er wordt een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes gerealiseerd, die minimaal 100 maal hoger is dan de titer van het inoculum. Deze reductiefactor wordt berekend aan de hand van de titer van het virale inoculum, de kweektijd na transductie, de halfwaardetijd van het virus op basis van het toegepaste envelopeiwit en het aantal wasstappen en inactiverende stappen.

5.5 Transfectie van animale en getransduceerde cellen met MERS-CoV replicon RNA

De aanvrager is van plan om animale cellen en lentiviraal getransduceerde animale cellen die niet-coderende RNA sequenties, afzonderlijke genen van MERS-CoV of combinaties hiervan bevatten, met andere MERS-CoV sequenties te transfecteren. De aanvrager geeft aan combinaties die door complementatie of recombinatie zouden kunnen leiden tot replicatiecompetent virus, uit te sluiten. Verder zal de aanvrager geen mutaties in het S gen introduceren om mogelijke verandering van gastheerspecificiteit en weefsel-specificiteit te voorkomen. De aanvrager geeft aan dat de genen coderend voor de structurele eiwitten M en E niet in het replicon RNA aanwezig zijn, zodat er geen virusdeeltjes geproduceerd kunnen worden. Evenals bij de eerdere experimenten zal het gastheermateriaal vrij zijn van lentivirussen, MERS-CoV en andere coronavirussen. De aanvrager zal tijdens de werkzaamheden in het veiligheidskabinet van klasse-II met *in vitro* getranscribeerd RNA geen werkzaamheden verrichten met replicatiecompetent coronavirus bevattende vectorstocks.

Op basis van deze maatregelen acht de COGEM het risico op het ontstaan van infectieus virus verwaarloosbaar klein en adviseert de COGEM deze werkzaamheden op ML-II in de schalen.

De aanvrager geeft aan tijdens deze werkzaamheden de verdere volgende voorschriften te hanteren:

- gedurende de handelingen met de in dit onderdeel genoemde vectoren worden in hetzelfde veiligheidskabinet van klasse-II geen handelingen verricht met wildtype coronavirussen of replicatie competente coronavirus bevattende vector stocks.

Voor de lentiviraal getransduceerde cellen afkomstig van ML-II inperkingsniveau geldt tevens:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd.

5.6 Productie en replicatie van competent infectieus (gg-)MERS-CoV

Bij het werken met replicatiecompetent infectieus MERS-CoV en genetisch gemodificeerde mutanten hiervan is het van belang infectie van de medewerker en uitsleep van het virus te voorkomen. Daartoe geeft de aanvrager aan dat de werkzaamheden in een veiligheidskabinet van klasse-II zullen plaatsvinden en dat de werknemer een beschermende bril, een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en handschoenen over de mouw van de werkkleding zal dragen.

Gezien de aard van het virus adviseert de COGEM deze werkzaamheden op ML-III inperkingsniveau in te schalen en kan zij instemmen met de voorgestelde voorschriften.

6. Conclusie

Gezien de aard van het virus, het verspreidingsrisico en de afwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling is de COGEM van mening dat MERS-CoV in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld moet worden.

De COGEM is van mening dat zowel de transfectie-experimenten met het complete genoom van MERS-CoV als de infectie met infectieus MERS-CoV op ML-III inperkingsniveau moeten plaatsvinden. De COGEM adviseert transfecties met delen van het MERS-CoV genoom waaruit geen infectieus virus kan ontstaan uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De COGEM adviseert experimenten met replicon RNA waarin de structurele eiwitten van M en E ontbreken uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De COGEM adviseert transductie-experimenten waarbij geen infectieus virus kan ontstaan in te schalen op ML-II inperkingsniveau. De COGEM adviseert kloneringen met delen van het MERS CoV genoom uit te voeren op ML-I inperkingsniveau en stemt in met het uitvoeren van kloneringen met het hele virusgenoom op ML-II inperkingsniveau.

Naar aanleiding van de specifieke vragen van het Bureau GGO merkt de COGEM het volgende op:

Betreffende de vraag of mutaties in de aangevraagde mutanten van MERS-CoV een verhoging zouden kunnen geven in pathogeniteit, virulentie en fitness merkt de COGEM op:

- De pathogeniteit, virulentie en fitness is van vele factoren afhankelijk. Aangezien het S eiwit de hostspecificiteit bepaalt, is dit het meest voor de hand liggende eiwit dat de pathogeniteit en virulentie beïnvloedt. Aangezien de aanvrager geen mutaties zal aanbrengen in het S gen ziet de COGEM geen reden om aan te nemen dat een mutant zal kunnen ontstaan die virulenter is dan het uitgangsvirus.

Naar aanleiding van de vraag of mutaties in MERS-CoV die geneesmiddelresistentie zou kunnen induceren kunnen plaatsvinden onder de voorgestelde classificatie, merkt de COGEM op:

- De indeling van MERS-CoV in pathogeniteitsklasse 3 is mede gebaseerd op het feit dat er geen profylaxe voor dit coronavirus bekend is. Zodende is het produceren van geneesmiddelresistente mutanten niet van invloed op de huidige pathogeniteitsklasse van het virus en de geadviseerde inperkingsniveau's.

Naar aanleiding van de vraag of door deletie van de structurele genen M en E de productie van replicatiecompetent infectieus virus voorkomen wordt, merkt de COGEM op:

- De structurele eiwitten M en E zijn essentieel voor de assemblage van een coronavirusdeeltje. Bovendien is de COGEM van mening dat de interactie van de eiwitten onderling en met het structurele N eiwit zeer specifiek is. Zij kan evenwel niet uitsluiten dat complementatie door een ander coronavirus mogelijk is. Door de voorwaarde dat de te gebruiken gastheercellen vrij zijn van coronavirussen wordt dit echter voorkomen en acht de COGEM de kans

verwaarloosbaar klein dat in voorgenomen experimenten infectieuze virusdeeltjes worden gevormd.

Als de voorgestelde werkzaamheden worden uitgevoerd op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van aangegeven aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Zaki AM *et al.* (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 367:1814-20
2. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. (1 augustus 2013) http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/
3. Omrani AS *et al.* (2013). A family cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus infections related to a likely unrecognized asymptomatic or mild case. *Int J Infect Dis.* 2013 Sep;17(9):e668-72. doi: 10.1016/j.ijid.2013.07.001. Epub 2013 Aug 2.
4. Memish ZA *et al.* (2013). Family Cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections. *N Engl J Med.* 2013 May 29. [Epub ahead of print]
5. Health Protection Agency (HPA) UK Novel Coronavirus Investigation team. 2013. Evidence of person-to-person transmission within a family cluster of novel coronavirus infections, United Kingdom, February 2013. *Euro Surveill.* 18:20427
6. Reusken CB *et al.* (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis.* doi:pii: S1473-3099(13)70164-6. 10.1016/S1473-3099(13)70164-6
7. King AMQ *et al.* (editors) (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego, Elsevier Academic Press
8. van Boheemen S *et al.* (2012). Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 3(6). pii: e00473-12. doi: 10.1128/mBio.00473-12
9. de Groot RJ *et al.* (2013). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol.* 87(14):7790-7792
10. VROM (2004). *Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen*
11. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahme_deutsch/09_Viren/hCoV-EMC.pdf?__blob=publicationFile&v=2
12. Public Health of Canada.
<http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/advi-avis/hce-che-2013-01-22-eng.php>

13. World Health Organization.
http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/Biosafety_InterimRecommendations_NovelCoronavirus_19Feb13.pdf
14. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-lab-biosafety.html>
15. COGEM (2003). Toekenning pathogeniteitsklasse voor het aan SARS geassocieerde coronavirus. COGEM Advies CGM/030429-01
16. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen. COGEM Advies CGM/090227-03
17. COGEM (2012). Inschaling van kloneringswerkzaamheden met genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen. COGEM Advies CGM/120307-01