

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 30 januari 2015
KENMERK CGM/150130-01
ONDERWERP Advies Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde norovirussen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel 'Determinanten van replicatie, pathogenese en host range van norovirussen' van het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)norovirussen. De aanvrager wil het ziekteverloop, de vermenigvuldiging en de gastheerspecificiteit van het norovirus bestuderen door onder andere norovirussen afkomstig uit mensen, muizen en varkens met elkaar te combineren. Hierbij zullen zogenoemde chimere virussen ontstaan.

Het humane norovirus is een zeer besmettelijk virus dat jaarlijks bij ongeveer een half miljoen mensen in Nederland buikgriep veroorzaakt. Meestal verdwijnen de symptomen na ongeveer twee tot drie dagen. Bij varkens en muizen verloopt een infectie doorgaans zonder ziekteverschijnselen. Op dit moment is er nog geen vaccin of antiviraal medicijn beschikbaar tegen het norovirus.

De COGEM heeft het norovirus ingedeeld in de op één na laagste pathogeniteitsklasse (klasse 2). Op basis van de huidige kennis van norovirussen en de ervaring met chimere virussen, is de COGEM van mening dat de chimere norovirussen minder ziekteverwekkend of net zo ziekteverwekkend als de oudervirussen zullen zijn.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de *in vitro* laboratoriumwerkzaamheden en de werkzaamheden in associatie met proefdieren op ML-II respectievelijk DM-II niveau plaatsvinden onder navolging van enkele aanvullende maatregelen.



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. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Inschaling van werkzaamheden met chimere genetisch gemodificeerde norovirussen

COGEM advies CGM/150130-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de vervaardiging van genetisch gemodificeerde (gg-) norovirussen en werkzaamheden met deze gg-virussen. Het gaat hierbij zowel om *in vitro* werkzaamheden als werkzaamheden in associatie met kleine en grote proefdieren. Doel van het onderzoek is om de determinanten van pathogenese, replicatie en gastheerspecificiteit van het norovirus te bestuderen. De aanvrager wil onder andere chimere norovirussen maken door isolaten afkomstig uit mensen, muizen en varkens met elkaar te combineren.

Norovirus

Een uitbraak van acute buikgriep (gastro-enteritis) op een basisschool in het plaatsje Norwalk, Ohio (Verenigde Staten) leidde in 1972 tot de identificatie van het eerste humane norovirus. Dit virus werd het Norwalk virus genoemd.^{1,2} In de jaren negentig werd het virus op basis van zijn genoomsequentie en het feit dat het niet omhuld wordt door een membraan, ingedeeld in de familie van de *Caliciviridae*, genus *Norovirus*.¹ Het genus omvat één species, dat echter zeer divers is en onderverdeeld wordt in zes zogenoemde genogroepen bestaande uit humane (GI, GII en GIV), varkens (GII), runderen (GIII), schapen (GIII), muizen (GV) en honden (GVI) norovirussen.^{3,4} De genogroepen zijn verder onder te verdelen in ongeveer 40 genotypen.⁵ Specifieke stammen worden meestal aangeduid via een combinatie van genogroep en genotype. Bij de mens komt bijvoorbeeld norovirus GII.4 op dit moment het meeste voor.⁵

Met het oog op de vergunningaanvraag zal hieronder nader worden ingegaan op de biologie van de norovirussen afkomstig uit mensen, muizen en varkens.

Humaan norovirus

Het humane norovirus is een zeer besmettelijk virus dat jaarlijks bij ongeveer een half miljoen mensen in Nederland buikgriep veroorzaakt.⁶ Uitbraken komen vaak voor op plaatsen waar grote groepen personen bij elkaar komen, zoals verzorgings- en verpleeghuizen, kinderdagverblijven en ziekenhuizen.

De eerste klachten treden na ongeveer 12 tot 48 uur op en bestaan onder andere uit braken, diarree, buikpijn, misselijkheid en hoofdpijn. Bij volwassenen verdwijnen de symptomen na twee tot drie dagen en bij kinderen na ongeveer een week. Bij risicogroepen, zoals ouderen en patiënten met een verzwakte afweer kunnen de klachten ernstiger zijn en soms tot ziekenhuisopname of sterfte leiden. In Nederland wordt 0,5% van de sterfte van mensen boven de vijftientig toegeschreven aan infecties met het norovirus.⁶ Asymptomatische infecties komen ook veelvuldig voor. Hoewel mensen met een asymptomatische infectie niet ziek worden, kunnen zij het virus wel uitscheiden in de ontlasting.¹

Het virus wordt overgedragen via voedsel en water, dat besmet is met ontlasting of via direct contact met een besmet persoon. Transmissie kan ook indirect plaatsvinden via besmette objecten, zoals de deurknop van het toilet. Tevens kan transmissie plaatsvinden via aërosolen die ontstaan tijdens het braken.⁶

Op dit moment bestaan er nog geen vaccins of antivirale middelen tegen humane norovirussen. Dit komt vooral door een gebrek aan een geschikt celkweekstelsel en proefdiermodel.¹ Hierdoor wordt het onderzoek naar deze virussen en de ontwikkeling van vaccins of antivirale middelen bemoeilijkt.

Muizen norovirus

Het muizen norovirus is de meest voorkomende ziekteverwekker bij laboratoriummuizen wereldwijd met een geschatte prevalentie van 64%.⁷ Het virus werd in 2003 geïsoleerd uit muizen met een sterk verzwakt immuunsysteem en werd murine norovirus 1 (MNV-1) genoemd. Inmiddels zijn er ook andere isolaten beschreven, waaronder MNV-2, MNV-3 en MNV-4.^{8,9}

MNV replicateert in macrofagen en dendritische cellen en infecteert de epitheelcellen in de lamina propria van de darm. Het virus wordt ook aangetroffen in de secundaire lymfoïde organen (Peyer's patches) in het laatste deel van de dunne darm.⁷ De mate waarin geïnfecteerde muizen ziek worden verschilt. Bepaalde wild-type laboratoriumstammen (zoals *inbred* 129 of *outbred* CD1 muizen) ontwikkelen geen duidelijke klinische symptomen terwijl een infectie bij sommige immuun gecompromitteerde laboratoriummuizen dodelijk kan zijn.⁷ Deze muizen vertonen klinische symptomen van encefalitis, vasculitis in de bloedvaten van de hersenen, longontsteking en hepatitis.¹⁰

Het muizen norovirus is het enige norovirus dat in celcultuur kan repliceren. Vanwege deze eigenschap wordt het virus gebruikt als modelorganisme om de kenmerken van norovirussen te bestuderen.¹⁰

Varkens norovirus

In 1998 werd noroviraal RNA aangetroffen in een monster uit de blinde darm van een volwassen varken in Japan.¹¹ Later werden ook andere stammen aangetroffen bij varkens in Europa, waaronder in Nederland.¹² Deze stammen zijn onderverdeeld in drie genotypen en behoren, net als de meest prevalentie humane stammen, tot genogroep GII. Eén stam (QW101) is genetisch zeer nauw verwant aan de humane GII-3/Mexico stam.^{13,14}

Tot op heden verlopen norovirale infecties in varkens asymptomatisch. In een aantal gevallen is milde diarree geconstateerd na inoculatie van het virus in zogenoemde *gnotobiotic pigs* (varkens die in een steriele omgeving zijn opgegroeid en waarvan precies bekend is welke micro-organismen er in het lichaam aanwezig zijn).¹³ De nauwe verwantschap tussen een varkensisolaat en een humaan isolaat roept de vraag op of co-infectie met deze virussen mogelijk kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe norovirusstammen.¹³

Genomische organisatie van het norovirus

Het norovirusgenoom is een positief, enkelstrengs RNA molecuul waarop in vrijwel alle gevallen drie *open reading frames* (ORFs) liggen. Alleen het muizen norovirus bevat nog een alternatief vierde ORF, dat overlapt met het tweede ORF. Dit vierde ORF codeert voor een virulentiefactor (VF1), dat een rol speelt als antagonist van de aangeboren immuunrespons tegen het virus.^{15,16} Het effect van VF1 op virulentie is stam-afhankelijk en vaak niet of beperkt zichtbaar, tenzij gebruik gemaakt wordt van muizen met een verzwakte afweer.^{16,17} Gezien dit beperkte effect en het feit dat andere norovirussen een VF1 eiwit missen, lijkt de invloed van een dergelijk eiwit op de fitness van het norovirus gelimiteerd.

ORF1 codeert voor één groot polyproteïne dat door een viraal protease genaamd Pro (3C-like) of NS6 (in het geval van de muis) co- en posttranslationeel verwerkt wordt tot zes niet-structurele eiwitten, waaronder het virale RNA-afhankelijke RNA polymerase (RdRp of NS7), een vermeend NTPase/RNA helicase genaamd NTPase (2C-like) of NS3, en de VPg (NS5), p48 (NS1/2) en p22 (NS4) eiwitten. Deze laatste twee eiwitten zijn betrokken bij de formatie van het replicatiecomplex.

ORF2 en ORF3 coderen voor respectievelijk de grote- en kleine capsid-eiwitten genaamd VP1 en VP2.¹⁶ De onderverdeling in genogroepen is gebaseerd op verschillen in de volledige sequentie van de capsideregio.¹⁰

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil onderzoek doen naar de determinanten van pathogenese, replicatie en gastheerspecificiteit van het norovirus. Hiertoe wil hij individuele genen afkomstig van humane, muizen en varkens norovirussen tot expressie brengen en op norovirus gebaseerde replicons produceren. Tevens wil de aanvrager chimere norovirussen vervaardigen door één of meerdere genen of delen van het genoom tussen maximaal twee verschillende norovirussen uit te wisselen. Ook wil de aanvrager puntmutaties aanbrengen in de polymerasegenen en capsidegenen om eventuele effecten op replicatie, gastheerspecificiteit en immunogeniciteit te bepalen. Op deze manier kan hij naar eigen zeggen met meer precisie aantonen welke aminozuren belangrijk zijn voor de bovenstaande specifieke eigenschappen.

Voor de productie van gg-norovirussen worden zowel plasmiden, lentivirale vectoren van de tweede generatie als een baculovirusexpressiesysteem gebruikt.

Classificaties van het norovirus

De COGEM heeft het norovirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁸ In de Duitse *Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 462* worden de humane stammen ingedeeld in *Risikogruppe 2* en de dierlijke stammen (afkomstig uit varkens, muizen en runderen) in *Risikogruppe 1*.¹⁹ In België is het norovirus door het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁰ Het *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) in Amerika beschouwt Calicivirussen als *Category B Priority Pathogens*; de op één na hoogste categorie van biologische agentia die een risico vormen voor de nationale veiligheid en volksgezondheid.²¹

Overweging

Pathogeniteit van wild-type norovirussen

Norovirussen komen algemeen voor in Nederland. De transmissie van het virus vindt plaats via de fecaal-orale route of via contact met besmette individuen of objecten. Het virus kan zich snel verspreiden op plaatsen waar grote groepen mensen bij elkaar komen.

Een infectie beperkt zich veelal tot het maag-darmkanaal van één gastheer. Voor slechts één humaan norovirus is in een proefdiermodel aangetoond dat het virus onder laboratoriumomstandigheden in het maagdarmkanaal van varkens kan repliceren.²²

Het humane norovirus veroorzaakt jaarlijks bij ongeveer een half miljoen Nederlanders buikgriep. De symptomen gaan in de meeste gevallen binnen twee tot drie dagen vanzelf over. Alleen bij risicogroepen, zoals ouderen en patiënten met een verzwakte afweer, kunnen de klachten ernstiger zijn en soms tot ziekenhuisopname of sterfte leiden. Varkens- en muizenorovirussen veroorzaken doorgaans alleen asymptomatische infecties in hun gastheer. Alleen bij laboratoriummuizen met een ernstig verzwakt afweersysteem kan een infectie dodelijk zijn. Op dit moment bestaan er nog geen vaccins of antivirale middelen tegen humane norovirussen.

Op basis van de huidige wetenschappelijke literatuur ziet de COGEM geen aanleiding om haar eerdere classificatie van de virussoort in pathogeniteitsklasse 2 te herzien.

Chimere norovirussen

De aanvrager wil chimere norovirussen vervaardigen door één of meerdere genen of delen van het genoom tussen maximaal twee verschillende norovirussen van mens, varken of muis uit te wisselen. Het is niet uitgesloten dat hierbij humane replicatiecompetente chimere norovirussen worden gemaakt die zich kunnen verspreiden in de populatie.

De COGEM is van mening dat chimere virussen over het algemeen geattenuëerd zijn ten opzicht van de oudervirussen. Het type genen en ook de functionaliteit van de genproducten (structurele en niet-structurele genen) tussen norovirussen zijn vergelijkbaar. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat natuurlijke recombinatie op kan treden tussen norovirussen die behoren tot dezelfde genogroep en afkomstig zijn uit dezelfde gastheer.¹⁰ Dit heeft tot op heden niet geleid tot virussen die pathogener zijn dan de oorspronkelijke oudervirussen.

Op basis van de huidige kennis van norovirussen, de ervaring met chimere virussen in het algemeen en de ervaring met natuurlijke recombinanten binnen hetzelfde genus, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de onder deze aanvraag vervaardigde chimere virussen pathogener zullen zijn dan de uitgangsvirussen.

Advies

Inschaling van in vitro werkzaamheden met gg-norovirus

Gebaseerd op bovenstaande overwegingen met betrekking tot de pathogeniteit van norovirussen in het algemeen en de verwachte pathogeniteit van chimere norovirussen in het bijzonder, is de COGEM van mening dat de *in vitro* werkzaamheden met gg-norovirussen en hiervan afgeleide

mutanten en chimere virussen plaats kunnen vinden op ML-II niveau. Gezien de mogelijke transmissieroutes van het virus adviseert de COGEM daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen dienen in een veiligheidsklasse-II kabinet te worden uitgevoerd.
- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht.

Wanneer tevens gewerkt wordt met genetisch gemodificeerde lentivirale vectoren, moeten conform het COGEM advies met betrekking tot de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren²³:

- de te gebruiken gastheermaterialen vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV en andere non-humane lentivirussen,
- handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere retrovirale vectorsystemen, en handelingen met de lentivirale vector, niet gelijktijdig in hetzelfde veiligheidskabinet uitgevoerd worden,
- tussen handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere retrovirale vectorsystemen en handelingen met de lentivirale vector in hetzelfde veiligheidskabinet, een marge van minimaal 30 minuten gehanteerd worden.

Inschaling van in vivo werkzaamheden met gg-norovirus

De voorgenomen werkzaamheden met proefdieren (muizen, fretten en varkens) adviseert de COGEM uit te voeren op DM-II inperkingsniveau.

De aanvrager stelt voor om de muizen te huisvesten in IVC bakken met hepafilter. Tevens is de aanvrager voornemens om de open handelingen met muizen, zoals infectie, monstername en necropsie uitvoeren in een veiligheidskabinet klasse II. Bij de *in vivo* werkzaamheden zullen handschoenen worden gedragen.

De experimenten met fretten en varkens wil de aanvrager uitvoeren in veiligheidsklasse III isolatoren. Dit is in het laboratorium van de aanvrager de standaard huisvesting voor infectie-experimenten met klasse 2 pathogenen in dieren die groter zijn dan muizen en ratten.

Gezien de transmissieroutes van norovirussen en het feit dat de norovirussen zich kunnen verspreiden in de populatie, kan de COGEM instemmen met de door aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen op DM-II niveau.

De COGEM is van mening dat de risico's van de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* experimenten met gg-norovirussen op ML-II en DM-II inperkingsniveau, met de daarbij beschreven aanvullende voorschriften, voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Robilotti E *et al.* (2015). Norovirus. *Clin Microbiol Rev* 28: 134-164
2. Kapikian AZ *et al.* (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081
3. Clarke IN *et al.* (2012). The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses, family *Caliciviridae*. In *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Edited by King AMQA, M J Elsevier Academic Press, Amsterdam
4. Karst SM *et al.* (2014). Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe* 15: 668-680
5. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (2013). Cib-IDS rapportage 2013. http://rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Uitgaven/Infectieziekten/Cib_IDS_rapportage_2013 (bezoekt: 21 januari 2015)
6. Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (2014). LCI-richtlijn Norovirus (Calicivirusinfectie). http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Norovirus_Calicivirusinfectie (bezoekt: 20 januari 2015)
7. Nelson AM *et al.* (2013). Murine norovirus infection does not cause major disruptions in the murine intestinal microbiota. *Microbiome* 1: 7
8. Wobus CE *et al.* (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80: 5104-5112
9. Hsu CC *et al.* (2007). Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes* 34: 147-155
10. Scipioni A *et al.* (2008). Animal noroviruses. *Vet J* 178: 32-45
11. Sugieda M *et al.* (1998). Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 143: 1215-1221
12. van Der Poel WH *et al.* (2000). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 6: 36-41
13. Wang QH *et al.* (2005). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 11: 1874-1881
14. Wang QH *et al.* (2007). Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* 25: 5453-5466
15. Thorne LG & Goodfellow IG (2014). Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* 95: 278-291
16. McFadden N *et al.* (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog* 7: e1002413
17. Zhu S *et al.* (2013). Identification of immune and viral correlates of norovirus protective immunity through comparative study of intra-cluster norovirus strains. *PLoS Pathog* 9: e1003592
18. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02
19. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA) (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462). <http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672902/publicationFile/48593/TRBA-462.pdf>

20. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezocht: 26 januari 2015)
21. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (2014). Biodefense and Emerging Infectious Diseases. <http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/pages/cata.aspx> (bezocht: 26 januari 2015)
22. Cheetham S *et al.* (2006). Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 80: 10372-10381
23. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03