

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

DATUM 13 oktober 2015
KENMERK CGM/151013-01
ONDERWERP Advies classificatie van *Mouse mammary tumor virus* en Murine stem cell virus

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de classificatie van twee virussen deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) en Murine stem cell virus (MSCV). Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen strikt dierpathogeen zijn.

MMTV kan borstkanker in vrouwtjesmuizen veroorzaken. Het virus is overdraagbaar via de moedermelk en wordt tijdens de puberteit van geïnfecteerde muizen actief. Er is geen vaccin of behandeling beschikbaar. Verspreiding naar andere diersoorten of de mens is nooit waargenomen. Op basis van deze argumenten is de COGEM van mening dat het MMTV een strikt dierpathogeen virus van klasse 2 is.

MSCV is geen natuurlijk virus maar een genetisch gemodificeerd chimeer virus. Het virus kan hematopoietische en embryonale stamcellen infecteren. MSCV kan alleen repliceren in de aanwezigheid van helpervirussen omdat een aantal essentiële functies ontbreken. Het is onbekend of het virus een ziekte veroorzaakt in mensen of dieren. Het MSCV is niet als aparte soort opgenomen in de lijsten van de 'International Committee on Taxonomy of Viruses'.

De COGEM hanteert als stelregel dat zij alleen replicatiecompetente virussen classificeert die van nature voorkomen en vaccinstammen die zich op natuurlijke wijze hebben aangepast aan specifieke (kweek)omstandigheden, zoals passage op specifieke cellijnen.

Op basis van bovenstaande overweging adviseert de COGEM MSCV niet in te delen in een pathogeniteitsklasse. Gezien de eigenschappen van de virussen waarvan het MSCV is afgeleid, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn wanneer *in vitro* werkzaamheden met (ecotroop) MSCV op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden.



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

Classificatie van *Mouse mammary tumor virus* en *Murine stem cell virus*

COGEM advies CGM/151013-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van twee virussen die behoren tot de familie van de *Retroviridae*. Het betreft het *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) en het Murine stem cell virus (MSCV). Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen als strikt dierpathogeen beschouwd kunnen worden.

Retroviridae

MMTV behoort tot de familie *Retroviridae*, de subfamilie *Orthoretrovirinae* en het genus *Betaretrovirus*.¹ MSCV is afgeleid van *Moloney murine sarcoma virus* (MoMSV) dat behoort tot het genus *Gammaretrovirus*.¹ In de subfamilie *Orthoretrovirinae* bevinden zich virussen van zoogdieren, vogels, reptielen en vissen. De virussen hebben twee positief-strengs RNA moleculen van 7-13kb als genoom.¹ Retrovirussen hebben de vier genen: *gag*, *pro*, *pol* en *env*.

Het *gag* codeert voor drie verschillende structurele eiwitten die de basis vormen van het virusdeeltje. Het gen *pro* codeert voor een protease. *Pol* codeert voor eiwitten die nodig zijn voor replicatie en integratie van het virale genoom in het DNA van de gastheer. Het *env* codeert voor het oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee voor de infectie. Deze onderdelen zijn essentieel voor replicatie en virulentie. Sommige retrovirussen bevatten additionele genen die betrokken zijn bij de regulatie van genexpressie en virusreplicatie.¹

Mouse mammary tumor virus

MMTV infecteert muizen en is voor het eerst ontdekt in inteeltstammen van muizen in 1933. In 1936 is gerapporteerd dat het virus via moedermelk overdraagbaar is.² MMTV bevat naast de genen *gag*, *pro*, *pol* en *env* twee additionele genen die onmisbaar zijn voor het virus. Het *sag* gen codeert voor een superantigeen en zorgt voor de verspreiding van de infectie.^{3,4} Het *rem* gen codeert voor een mRNA transporteiwit dat betrokken is bij de export van het virale mRNA uit de nucleus van de geïnfekteerde cel.⁵

In verschillende muizenstammen in laboratoria zijn endogene MMTV sequenties aanwezig.⁶ Ook in wilde muizen zijn MMTV sequenties aangetoond. Het is niet duidelijk of dit virus of endogene sequenties betreft.^{6,7} Het is onbekend of MMTV in het wild voorkomt.

MMTV infecteert B-cellen. Het virus wordt actief in oestrogeen gevoelig weefsel tijdens de puberteit van geïnfekteerde muizen.^{3,5} Het virus kan borsttumoren veroorzaken bij volwassen vrouwtjesmuizen. De borsttumoren ontstaan als gevolg van de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer, maar ook het MMTV envelopeiwit speelt een rol bij het ontstaan van tumoren. De tumorontwikkeling duurt 6 tot 9 maanden.⁸ Er is geen behandeling beschikbaar tegen MMTV.

MMTV is door de ATCC geclassificeerd als een 'Biosafety level' 2 virus.⁹ In de Duitse Technische Regeln für Biologische Arbeitstoffe 462 is dit virus ingedeeld in 'Risikogruppe' 2.¹⁰

Murine stem cell virus

MSCV is een chimeer genetisch gemodificeerd virus dat is opgebouwd uit elementen van andere virussen. Het virus is gebaseerd op Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) die weer afgeleid is van het replicatiedeficiënte *Moloney murine sarcoma virus* (MoMSV). Net als MoMSV bevat MSCV cellulaire *mos* sequenties.¹¹ Behalve het genetische materiaal van MPSV bevat MSCV een door celkweek ontstane modificatie in de '*long terminal repeat*'. Daarnaast zijn door middel van genetische modificatie aanpassingen aangebracht. In MSCV is de leader van MPSV vervangen door de leader van het endogene retrovirus dl587 rev en is het packaging signaal van MoMSV. MSCV komt na infectie van hematopoietische en embryonale stamcellen tot expressie.

In MPSV ontbreekt een groot deel van de retrovirale *env* regio en ontbreken delen van het *pol* gen.¹² Hierdoor is het virus replicatie-defectief. MSCV heeft daarom net als MPSV en MoMSV een helpervirus nodig om te kunnen repliceren. MSCV kan door de aanwezigheid van het *mos* gen sarcoma's induceren in muizen.

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.

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.

Classificatie van dierpathogenen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden. 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. De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen: het ziekmakende potentieel, de enzoötische aanwezigheid, het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme en 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.¹³

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de inschaling van MMTV. In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van de twee retrovirussen MoMSV en MPSV.¹¹ Deze virussen zijn net als MSCV afgeleid van *Murine leukemia virus* (MLV). MLV, MoMSV en MPSV zijn als strikt dierpathogeen virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{11,13}

Overweging en advies

Classificatie van MMTV

MMTV infecteert muizen via de moedermelk en kan kanker in volwassen vrouwtjesmuizen veroorzaken. Verspreiding naar andere diersoorten of de mens is niet gerapporteerd in de wetenschappelijke literatuur. De COGEM is van mening dat het ziekmakend potentieel van MMTV beperkt is tot muizen. Onder laboratoriumcondities is de verspreiding van het virus via de moedermelk te voorkomen door muizen te laten zogen bij gezonde muizen. Er zijn MMTV sequenties aangetoond in wilde muizen, maar het is onbekend of deze afkomstig zijn van virus of van endogene sequenties in het genoom van de muis. Er is geen behandeling beschikbaar.

Het virus veroorzaakt alleen een ziekte in muizen. Er zijn geen aanwijzingen dat de mens met dit virus geïnfecteerd kan worden. Daarom is de COGEM van mening dat MMTV een strikt dierpathogeen virus is.

Op basis van bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM MMTV als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Werkzaamheden met MSCV

MSCV komt na infectie van hematopoietische en embryonale stamcellen tot expressie. Omdat het virus een aantal essentiële functies mist, is het virus replicatiedeficiënt en heeft het een helpervirus nodig om te kunnen repliceren. Bij afwezigheid van het benodigde helpervirus kan MSCV zich *in vivo* niet vermenigvuldigen. Het is onbekend of het virus een ziekte veroorzaakt in mensen of dieren.

De COGEM merkt op dat MSCV via genetische modificatie tot stand is gekomen en niet als aparte soort is opgenomen in de lijsten van de 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV).¹⁴ De COGEM wijst er op dat door genetische modificatie er vele virusvarianten gemaakt kunnen worden. Tot op heden worden de werkzaamheden met dergelijke varianten casus-gewijs ingeschaald op basis van de eigenschappen van de uitgangsvirussen. De COGEM acht het weinig zinvol en onhaalbaar om alle verschillende genetisch gemodificeerde virusvarianten apart te classificeren. Bovendien zal door een dergelijk exercitie het aantal virusvarianten op Bijlage 4 van Regeling ggo milieubeheer 2013 sterk toenemen, wat de toepasbaarheid en transparantie van deze Bijlage niet ten goede komt.

De COGEM hanteert als uitgangspunt dat zij alleen replicatiecompetente virussen classificeert die van nature voorkomen. Tevens zullen virussen geclassificeerd worden die als vaccinstam gebruikt worden en zich op een natuurlijke wijze hebben aangepast aan specifieke (kweek)omstandigheden, zoals passage op specifieke cellijnen.

Op basis van bovenstaande overweging adviseert de COGEM MSCV niet in te delen in een pathogeniteitsklasse. Gezien de eigenschappen van de virussen waarvan het MSCV is afgeleid, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn wanneer *in vitro* werkzaamheden met MSCV in combinatie met een ecotrope helpervirus op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden.

Met betrekking tot de inschaling van werkzaamheden met het MSCV wijst de COGEM op de mogelijkheid dat de combinatie van MSCV met een amphotrope of xenotrope retrovirus helper kan leiden tot de productie van een MSCV met een uitgebreid gastheerbereik, waaronder mogelijk de mens. Zoals eerder aangegeven in haar advies "Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met ecotrope muizen retrovirussen" kan de COGEM op basis van beschreven contaminatie van cellijnen met retrovirale sequenties niet uitsluiten dat dit onbedoeld zal plaatsvinden.¹⁵ Gezien de mogelijke gevolgen van geactiveerd c-mos voor de medewerker dient onbewuste blootstelling aan amphotroop of xenotroop MSCV voorkomen te worden. Daarom adviseert de COGEM bij werkzaamheden met het MSCV regelmatig te verifiëren dat er geen amphotroop of xenotroop helpervirus aanwezig is.

Referenties

1. Stoye JP *et al.* (2012). Family Retroviridae. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
2. Bittner JJ (1936). Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* 84: 162
3. Reuss FU & Coffin JM (1998). Mouse mammary tumor virus superantigen expression in B cells is regulated by a central enhancer within the pol gene. *J Virol.* 72: 6073-6082
4. Golovkina TV *et al.* (1998). B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland. *J Immunol.* 161: 2375-2382
5. Mertz JA *et al.* (2005). Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. *J Virol.* 79: 14737-14747
6. Imai S *et al.* (1994). Distribution of mouse mammary tumor virus in Asian wild mice. *J Virol.* 68: 3437-3442
7. Faedo M *et al.* (2007). Prevalence of mouse mammary tumor virus (MMTV) in wild house mice (*Mus musculus*) in southeastern Australia. *J Wildl Dis.* 43: 668-674
8. Dudley JP (2008). Mouse Mammary Tumor Virus. In *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. Ed. Mahy BWJ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
9. American Tissue Culture Collection (2015). Mouse mammary tumor virus (ATCC® 45005™) www.lgcstandards-atcc.org/products/all/45005.aspx (bezocht: 16 juni 2015)
10. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA) (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462).

www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672902/publicationFile/48593/TRBA-462.pdf (bezoekt: 16 juni 2015)

11. COGEM (2015). Classificatie van vier retrovirussen. COGEM advies CGM/150529-01
12. Stacey A *et al.* (1984). Comparison of myeloproliferative sarcoma virus with Moloney murine sarcoma virus variants by nucleotide sequencing and heteroduplex analysis. *J Virol.* 50: 725-732
13. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
14. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2014 Release.
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (bezoekt: 10 september 2015)
15. COGEM (2014). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met ecotrope muizen retrovirussen.
COGEM advies CGM/140228-01