

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

**DATUM** 30 november 2016  
**KENMERK** CGM/161130-02  
**ONDERWERP** Advies classificatie en inschaling werkzaamheden *Gallid herpesvirus 3*

Geachte mevrouw Dijkma,


Naar aanleiding van het dossier 'Inschaling Marek's disease virus serotype 2 (MDV-2)' (IG 16-333\_2.8-000) ingediend door Intervet International B.V. deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3), ook wel bekend onder de naam Marek's disease virus type 2. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) GaHV-3. Ten behoeve van vaccinontwikkeling wil de aanvrager wildtype GaHV-3 van diverse markergenen voorzien.

GaHV-3 is enzoëtisch binnen de pluimveehouderij en wordt algemeen verondersteld geen aanleiding te geven tot ziekte. In de wetenschappelijke literatuur is er echter anekdotisch bewijs dat het virus lymfomen kan veroorzaken. Verspreiding van het virus vindt plaats via de lucht of door middel van (in)direct contact. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat het virus ziekte veroorzaakt bij de mens. Op basis hiervan adviseert de COGEM GaHV-3 als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De voorgenomen kloneringswerkzaamheden van virale genoomsequenties in *Escherichia coli* adviseert de COGEM uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Productie van en infectie met replicerend gg-GaHV-3 adviseert zij uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Indien daarbij tevens enkele aanvullende voorschriften in acht worden genomen om aerogene en contacttransmissie te voorkomen, acht de COGEM de risico's bij 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. 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 belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. T. Boekhout niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Classificatie en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Gallid herpesvirus 3*

## COGEM advies CGM/161130-02

### Inleiding

Naar aanleiding van het dossier IG 16-333, getiteld 'Inschaling Marek's disease virus serotype 2 (MDV-2)', is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van Marek's disease virus serotype 2 (MDV-2) en over de inschaling van werkzaamheden met hiervan afgeleide genetisch gemodificeerde (gg-) virussen. Tevens is de COGEM gevraagd of het virus als strikt dierpathogeen beschouwd dient te worden.

Volgens de nomenclatuur van de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) heet Marek's disease virus serotype 2 tegenwoordig *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3).<sup>1</sup> In het voorliggende advies zal de COGEM de huidige naamgeving van de ICTV aanhouden.

### Ziekte van Marek en de daarmee geassocieerde virussen

De ziekte van Marek ('Marek's disease' of MD) komt voor bij pluimvee en wordt gekenmerkt door een woekering van witte bloedcellen (T-cel lymfoom) waardoor het zenuwstelsel aangetast wordt. De ziekte gaat onder meer gepaard met verlamingsverschijnselen en kent een acute en latente fase.<sup>2,3</sup> MD wordt veroorzaakt door *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2), ook wel bekend onder de oudere namen Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) of Marek's disease virus (MDV).<sup>1</sup>

Naast GaHV-2 werden er vroeger nog twee andere Marek's disease virusserotypen onderscheiden: Marek's disease virus serotype 2 (MDV-2) en Marek's disease virus serotype 3 (MDV-3). Deze virussen worden tegenwoordig als verschillende virussoorten beschouwd. Marek's disease virus serotype 2 heet *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3), en Marek's disease virus serotype 3 wordt *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1) genoemd.<sup>1</sup> MeHV-1 is ook bekend onder de naam Turkey herpesvirus of Herpesvirus of turkeys (HVT). GaHV-2, GaHV-3 en MeHV-1 behoren tot de familie *Herpesviridae*, de subfamilie *Alphaherpesvirinae*, en het genus *Mardivirus*.<sup>1</sup> Een overzicht van de diverse naamgevingen wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Familie	Genus	Soort	Alternatieve naam
<i>Herpesviridae</i>	<i>Mardivirus</i>	<i>Gallid herpesvirus 2</i> (GaHV-2)	Marek's disease virus type 1 (MDV-1) Marek's disease virus (MDV)
		<i>Gallid herpesvirus 3</i> (GaHV-3)	Marek's disease virus type 2 (MDV-2)
		<i>Meleagrid herpesvirus 1</i> (MeHV-1)	Marek's disease virus type 3 (MDV-3) Herpesvirus of turkeys (HVT) Turkey herpesvirus

### ***Gallid herpesvirus 3***

GaHV-3 is een dubbelstrengs DNA virus en bezit een genoom van ongeveer 165 kilobasenparen.<sup>4</sup> Fylogenetisch gezien is GaHV-3 meer verwant aan het kalkoenenvirus MeHV-1 dan aan het kippenvirus GaHV-2. De sequentiehomologie met GaHV-2 bedraagt op nucleotideniveau 61%.<sup>4</sup>

GaHV-3 is enzoötisch binnen de pluimveehouderij en lijkt geen ziekte te veroorzaken.<sup>5,6</sup> Het virus replicateert in de epitheelcellen van de veerfollikels en wordt via huidschilfers uitgescheiden. Verspreiding vindt door de lucht plaats via besmette huidschilfers en via de mest. Daarnaast kan het virus door middel van (in)direct contact overgedragen worden.<sup>7,8</sup>

Bepaalde GaHV-3 stammen (SB-1, HPRS-24) worden bij kippen als levend vaccin toegepast omdat deze kruisbescherming bieden tegen MD.<sup>7,8,9,10</sup> Er zijn echter enkele aanwijzingen dat deze vaccinstammen lymfomen zouden kunnen induceren.<sup>11,12,13</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil ten behoeve van vaccinontwikkeling replicierend gg-GaHV-3 gaan produceren en hiermee animale cellen infecteren. Daartoe zal wildtype GaHV-3 van diverse markergenen worden voorzien. Standaard kloneringwerkzaamheden voor de constructie van gg-GaHV-3 zullen plaats vinden in *Escherichia coli* K12.

### **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 microorganismen 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 mens- en dierpathogene virussen, of de groep van strikt dierpathogene virussen worden gerekend.

### **Classificatie 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.<sup>16</sup> 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 menspathogenen. 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.<sup>14</sup> 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.

### **Eerdere COGEM adviezen**

In 2013 heeft de COGEM de toenmalige lijst met pathogene micro-organismen tegen het licht gehouden en de classificatie van de virussen opnieuw getoetst.<sup>15</sup> Daarin werd geadviseerd GaHV-2 en MeHV-1 in te delen in pathogeniteitsklasse 2. In 2014 heeft zij geadviseerd beide virussen als strikt dierpathogeen aan te merken.<sup>16</sup>

### **Classificaties andere beoordelende instanties**

Het Belgische Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP), het Duitse Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA), het Duitse 'Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit' (BVL/ZKBS), en het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) hebben GaHV-3 ingedeeld als een dierpathogeen van risicogroep 2.<sup>17,18,19,20</sup>

### **Overwegingen en advies**

#### ***Classificatie Gallid herpesvirus 3***

GaHV-3 is enzoötisch binnen de pluimveehouderij en wordt algemeen verondersteld geen aanleiding te geven tot ziekte.<sup>5</sup> In de wetenschappelijke literatuur is er echter anekdotisch bewijs dat het virus lymfomen kan veroorzaken. Verspreiding van het virus vindt plaats via de lucht of door middel van (in)direct contact. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat het virus ziekte veroorzaakt bij de mens. Op basis hiervan adviseert de COGEM GaHV-3 als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

#### ***Inschaling werkzaamheden***

Gezien de indeling van GaHV-3 in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de voorgenomen kloneringswerkzaamheden in *E. coli* - conform Regeling ggo<sup>21</sup> - onder de daarvoor geldende werkvoorschriften op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.

De voorgenomen *in vitro* werkzaamheden ten behoeve van de productie van replicerend gg-GaHV-3 en het testen van het gg-virus op animale cellijnen, adviseert de COGEM uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Om eventuele aerogene verspreiding en contacttransmissie van replicerend virus te voorkomen, acht de COGEM het van belang dat daarbij de volgende aanvullende voorschriften in acht worden genomen:

- open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II,
- het dragen van handschoenen is verplicht.

Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de bovenstaande aanvullende voorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verbonden aan de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met gg-GaHV-3, verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. King AMQ *et al.* (2012). Order *Herpesvirales*. 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. Trapp S & Osterrieder N (2008). Herpesviruses of birds. In: *Encyclopedia of Viruses*, 405-411. Elsevier Academic Press
3. Osterrieder N *et al.* (2006). Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature reviews, Microbiology*, 4: 283-294
4. Spatz SJ & Schat KA (2011). Comparative genomic sequence analysis of the Marek's disease vaccine strain SB-1. *Virus Genes* 42: 331-338
5. Biggs PM & Milne DS (1972). Biological properties of a number of Marek's disease virus isolates. In: *Oncogenesis and Herpesviruses*. Ed. Biggs PM *et al.*, IARC Scientific Publications, Lyon
6. Couteaudier M & Denesvre C (2014). Marek's disease virus and skin interactions. *Vet. Res.* 45: 36-48
7. Schat KA & Calnek WW (1978). Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 1075-1082
8. Witter RL *et al.* (1987). New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected biological and molecular characteristics. *Avian Dis.* 31: 829-840
9. von Bülow V *et al.* (1975). Characterization of new serotype of Marek's disease herpesvirus. In: *Oncogenesis and herpesviruses II*. Ed. de The G *et al.*, IARC Scientific Publications, Lyon
10. Calnek BW *et al.* (1980). Modification of Marek's disease pathogenesis by in ovo infection or prior vaccination. In: *Viruses in naturally occurring cancers*. Ed. Essex M *et al.*, Cold Spring Harbor, New York
11. Bacon LD *et al.* (1989). Augmentation of retrovirus-induced lymphoid leucosis by Marek's disease herpesviruses in white leghorn chickens. *J. Virol.* 63: 504-512
12. Pol JMA *et al.* (1985). Studies on the oncogenic properties of various Marek's disease virus strains. In *Proc. Int. Symp. Marek's Dis.* American Association of Avian Pathologists. Ed. Calnek BW & Spencer JL, Kenneth Square, PA
13. Salter DW *et al.* (1999). Enhancement of spontaneous bursal lymphoma frequency by serotype 2 Marek's disease vaccine SB-1, in transgenic and non-transgenic line 0 white leghorn chickens. *Avian Pathol.* 28: 147-154
14. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
15. COGEM (2013). Classificatie van humaan en dierpathogene DNA virussen. COGEM advies CGM/130917-01
16. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
17. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) (2008). Biosafety and Biotechnology Unit (SBB), Belgian Biosafety Server. [www.biosafety.be/RA/Class/ClassBEL.html](http://www.biosafety.be/RA/Class/ClassBEL.html) (bezocht: 28 november 2016)
18. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA; 2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462) [www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/TRBA-462.html](http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/TRBA-462.html) (bezocht: 28 november 2016)

19. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/ Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (BVL/ZKBS) (2016). Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen. [www.bvl.bund.de/DE/06\\_Gentechnik/03\\_Antragsteller/06\\_Institutionen\\_fuer\\_biologische\\_Sicherheit/01\\_ZKBS/03\\_Organismenliste/gentechnik\\_zkbs\\_organismenliste\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html) (bezoekt: 28 november 2016)
20. Federal Office for the Environment (FOEN) (2010). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. [www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en](http://www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en) (bezoekt: 28 november 2016)
21. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. [www.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html](http://www.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html) (bezoekt: 21 november 2016)