

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

11 juli 2006
CGM/060711-01
Advies inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd MKZV

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 06-003, 'Karakterisatie van het genoom van *Mond-en-klauwzeervirus* (MKZV)' van de stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, CIDC-Lelystad, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met gg-recombinant *Mond-en-klauwzeervirus* (MKZV). De aanvrager wil onderzoeken waarom sommige MKZV stammen minder virulent zijn. Dit kan aanknopingspunten bieden voor de ontwikkeling van antivirale middelen. Om dit te onderzoeken is de aanvrager van plan van een zogenaamde infectieuze kloon van het MKZV genoom te maken en genen tussen de verschillende MKZV stammen uit te wisselen.

De COGEM heeft onlangs in een algemeen advies criteria voor de inschaling in pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen gegeven en de daaraan gekoppelde werk- en inrichtingsvoorschriften voor recombinant DNA werkzaamheden. Deze voorschriften verschillen van de in de Regeling ggo vermelde werk- en inrichtingsvoorschriften voor pathogenen omdat dierpathogenen wel een milieurisico vormen, maar niet gevaarlijk zijn voor de mens. Dit is de eerste keer dat werkzaamheden met dierpathogene virussen op basis van dit algemene advies worden beoordeeld en ingeschaald.

De COGEM is van mening dat de werkzaamheden onder ML-III condities met aanvullende en gewijzigde voorschriften moeten worden uitgevoerd. De recombinante MKZ-virussen die in het project worden geproduceerd, verschillen qua eigenschappen niet van wildtype virussen. Er worden geen nieuwe eigenschappen of genen toegevoegd aan het virus.

De COGEM is van mening dat met in achtneming van de voorgeschreven maatregelen de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'Z' followed by a long horizontal stroke that ends in a small hook.

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

Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos

Dr. R.C. Zwart

Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Mond-en-klauwzeervirus*

COGEM advies CGM/060711-01

1 INLEIDING

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor werkzaamheden met *Mond-en-klauwzeervirus* (MKZV) van het CIDC-Lelystad. De vergunningaanvrager is van plan om zowel genen van MKZV alsmede volvirulent genetisch gemodificeerd MKZV in dierlijke cellen tot expressie te brengen.

In de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo) worden organismen en virussen op basis van hun pathogeniteit onderverdeeld in vier klassen. Aan elke klasse is een bepaald niveau van inperking en werkvoorschriften gekoppeld. Grofweg betekent dit dat ggo-werkzaamheden met een klasse 1 organisme kunnen plaatsvinden in een ML-I laboratorium terwijl werkzaamheden met een klasse 4 pathogeen in een ML-IV ruimte moeten plaatsvinden. Deze gehele systematiek is ontwikkeld voor pathogenen van de mens. Zowel de indelingscriteria als de inrichtings- en werkvoorschriften zijn primair gericht op de bescherming van de mens, zowel de mensen buiten de werkruimten als de laboratoriummedewerkers zelf.

Dierpathogene virussen zijn in principe ingedeeld in klasse 2 (van humane pathogenen). Bescherming van laboratoriummedewerkers is immers niet aan de orde, aangezien het dierpathogenen betreft. De aan klasse 2 gekoppelde inrichtings- en werkvoorschriften bieden over het algemeen voldoende waarborgen dat verspreiding van het genetisch gemodificeerde pathogeen uit het laboratorium niet zal optreden.

Echter er zijn een aantal dierpathogene virussen die extra maatregelen vereisen om ontsnapping uit laboratoriumruimten tegen te gaan. Het betreft virussen zoals MKZV of varkenspestvirus, die zich snel kunnen verspreiden, nauwelijks onder controle te brengen zijn en grote schade bij hun gastheer (dierpopulaties) kunnen aanrichten. In het verleden is daarom voor deze virussen een uitzonderingsklasse 2D ingesteld, waarbij aanvullende eisen met betrekking tot de inrichting van de laboratoria en de dierverblijven, waarin de ggo-werkzaamheden plaatsvinden, werden gesteld.

Bij de implementatie van de EU richtlijn 2001/18 in de Nederlandse regelgeving bleek het hanteren van een uitzonderingsklasse ongewenst. Het ministerie van VROM vroeg de COGEM daarom om nieuwe criteria voor de classificatie van dierpathogene virussen op te stellen. Dit bleek een weerbarstige materie. Een eerste advies van de COGEM was voor het ministerie moeilijk toepasbaar. In overleg met het ministerie heeft de COGEM daarop een herzien advies uitgegeven (1) met onder meer een nadere uitwerking van de noodzakelijke inrichtings- en werkvoorschriften. In het

COGEM advies worden 4 klassen onderscheiden voor de indeling van dierpathogene virussen. Behalve criteria voor de indeling van de virussen worden ook per klasse de noodzakelijke inrichtings- en werkvoorschriften gegeven om ontsnapping van de virussen te voorkomen. Deze inrichtings- en werkvoorschriften wijken af van de voorschriften zoals vermeld in de Regeling ggo omdat bescherming van de laboratoriummedewerkers geen rol speelt.

Bij de onderhavige vergunningaanvraag is het de eerste keer dat het algemene advies van de COGEM over de indeling van dierpathogene virussen door het ministerie als vergunningverlenende instantie wordt toegepast.

1.2 Mond-en-klauwzeervirus

MKZV behoort tot de familie van de *Picornaviridae* en het genus *Aphthovirus* (2). Dit zijn kleine bolvormige virussen (ca 30 nm) met een enkelstrengs RNA genoom. Het genoom is ongeveer 8.500 nucleotiden lang (2,3). Het genoom wordt afgelezen als een groot polypeptide, waarna door middel van proteolytische klieving de functionele eiwitten ontstaan. De virussen zijn relatief eenvoudig van structuur. De mantel van het virus is opgebouwd uit 60 units van drie eiwitten, daarnaast is nog een vierde eiwit in het deeltje aanwezig. Er zijn in totaal 7 immunologisch verschillende serotypen bekend (3). De MKZVdeeltjes zijn opmerkelijk stabiel. Onder normale temperaturen blijft het virus in stalstof 8 tot 14 dagen infectieus (4).

Niet alleen de stabiliteit van het virus maar ook de wijze van overdracht en het ziektebeeld maakt MKZV tot een van de meest besmettelijke diervirussen. Het virus wordt overgedragen door zowel direct als indirect contact (mensen, vervoermiddelen, dierlijke producten) en kan zich ook verspreiden door de lucht. Bekend is dat het virus zich over afstanden van 60 km over land en 300 km over zee kan verspreiden. Besmette dieren scheiden grote hoeveelheden virus uit. MKZV infecteert herkauwers en varkens. Dieren kunnen na besmetting jarenlang virusdrager blijven en nieuwe infecties veroorzaken. Bij schapen is het ziektebeeld vaak onduidelijk, de ziekte kan zich daardoor ongemerkt verspreiden. Bij andere dieren kan het ziektebeeld zeer ernstig zijn. De symptomen bestaan uit blaarvorming in de mondholte en aan de hoeven, uiers of snuiten. Klauwlaesies kunnen resulteren in ernstige aantasting van de hoeven, secundaire infecties leiden tot gewrichtsontstekingen. Mond en klauwzeer is vaak dodelijk voor jonge dieren als gevolg van myocarditis. Op grond van deze karakteristieken heeft de COGEM het MKZV in de hoogste dierpathogeniteitsklasse ingedeeld. Opgemerkt moet worden dat een uitbraak van MKZV grote maatschappelijke (en economische) consequenties heeft.

1.3 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil onderzoeken waarom sommige MKZV-stammen niet in staat zijn om de zogenaamde aspecifieke afweer van geïnfecteerde cellen te onderdrukken.

Virusstammen die hiertoe niet in staat zijn, veroorzaken relatief milde klinische symptomen in runderen, hebben een verlaagde virusuitscheiding en zijn daardoor minder goed tot verspreiding in staat. Inzicht in hoe het mechanisme waarmee het virus de afweer onderdrukt, is van belang voor het ontwikkelen van antivirale middelen.

De aanvrager is daarom van plan een infectieuze kloon van het virale genoom te maken. Door middel van standaard moleculaire biologische technieken zoals cDNA synthese met behulp van reverse transcriptase, PCR en kloneringen zal een cDNA kopie van het volledige RNA genoom gemaakt worden. Deze kan vermenigvuldigd en in stand gehouden worden door het te kloneren in een plasmide in *E. coli*. Door het cDNA onder controle te brengen van een T7 (of vergelijkbare) promotor kan het DNA vervolgens na toevoeging van het enzym T7 polymerase *in vitro* vertaald worden in (infectieus) RNA. Het gesynthetiseerde RNA transcript kan vervolgens gebruikt worden om eukaryote cellen te infecteren waarna virusdeeltjes gevormd worden. Het gebruik van virale infectieuze klonen is een veel gebruikte onderzoeksmethode in de virologie. Van tal van verschillende virussen zijn infectieuze klonen gemaakt. Drie andere onderzoeksgroepen hebben eerder een infectieuze kloon van MKZV gesynthetiseerd (5,6,7). Indien de aanvrager er onverhoopt niet in slaagt een infectieuze kloon te synthetiseren zal hij proberen gebruik te maken van één van de elders in de wereld geproduceerde klonen.

Door genen in de infectieuze kloon te verwisselen met genen afkomstig uit andere MKZ typen en de recombinante virussen te testen in bioassays op dierlijke cellen hoopt de aanvrager inzicht te verkrijgen in welke genen bijdragen aan het onderdrukken van de antivirale respons van de dierlijke cel.

Daarnaast is de aanvrager van plan individuele of combinaties van genen van MKZV tot expressie te brengen in varkensniercellen of insectencellen om te bestuderen wat de effecten van de eiwitten zijn op het metabolisme van de cel.

2 ADVIES

2.1 De adviesvraag

De vergunningaanvrager is van plan om genen van MKZV en volvirulent genetisch gemodificeerde MKZV in cellen tot expressie te brengen.

Het ministerie van VROM heeft bij monde van het Bureau GGO een voorstel tot inschaling opgesteld. In dit voorstel tot inschaling legt het Bureau GGO de COGEM twee opties voor: in het ene geval wordt uitgegaan van een ML-IV ruimte met wijzigingen in de voorschriften, in de andere optie wordt uitgegaan van een ML-III ruimte waarbij deels aanvullende voorschriften worden opgelegd. Het uiteindelijk gerealiseerde inperkingsniveau van deze twee inschalingsopties is gelijk. Daarnaast stelt het Bureau de COGEM een aantal specifieke detailvragen.

2.2 ML-III of ML-IV

De COGEM heeft in haar algemene advies over dierpathogene virussen de noodzakelijke inrichtingsvoorschriften aan de hand van de in de Regeling ggo vermelde voorschriften weergegeven. Dit betekent bijvoorbeeld dat voor klasse 4 dierpathogene virussen gesteld is dat de maatregelen die gericht zijn op het tegengaan van ontsnapping, zoals onderdruk, HEPA filters in de ontluchtingskanalen, douches voor medewerkers etc, gelijk moeten zijn aan die van een ML-IV ruimte.

Hiermee heeft de COGEM niet bedoeld dat de werkruimten daadwerkelijk ML-IV ruimten behoeven te zijn. De term ML-IV ruimte (of ML-III bij klasse 3 pathogenen) is slechts gebruikt om te refereren aan een deel van de inrichtingsvoorschriften die de COGEM noodzakelijk acht om ontsnapping tegen te gaan.

Door de in de Regeling gehanteerde aanduidingen te gebruiken en een overzicht te geven van de aanpassingen op de voorschriften heeft de COGEM geprobeerd de haar inziens noodzakelijke maatregelen het beste inzichtelijk te maken. De COGEM heeft in haar advies ook duidelijk gesteld dat de maatregelen gericht tegen ontsnapping zowel op 'unit' of 'onderdrukgebied'-niveau genomen kunnen worden. Binnen zo'n gebied kunnen meerdere laboratoria, werkruimten of andere ruimten gesitueerd zijn. Door meerdere ruimten binnen de inperkende unit te vestigen kunnen efficiëntievoordelen en aanzienlijke kostenbesparingen gerealiseerd worden. Dit in tegenstelling tot een ML-IV ruimte waarbinnen alleen de echte werkruimte valt, zodat laboratoriummedewerkers in de aangrenzende ruimtes beschermd worden tegen het humaan pathogeen waarmee onder ML-IV gewerkt wordt.

Het ministerie heeft twee opties tot inschaling van de werkruimte voor werkzaamheden met MKZV voorgelegd. In het eerste geval wordt uitgegaan van een ML-IV ruimte en worden een aantal inrichtingsvoorschriften gewijzigd of geschrapt. Bij de tweede optie wordt uitgegaan van ML-III en worden een aantal voorschriften toegevoegd, gewijzigd of geschrapt.

MKZV is door de COGEM als klasse 4 ingedeeld. In haar eerdere advies heeft de COGEM de werk- en inrichtingsvoorschriften behorende bij werkzaamheden met deze klasse virussen weergegeven. De twee opties van het ministerie leiden feitelijk tot exact dezelfde inperkingsvoorschriften en komen beide overeen met de door de COGEM noodzakelijke geachte maatregelen. Vanuit milieuveiligheidsoogpunt is de COGEM dan ook van mening dat beide opties voldoen.

De COGEM is van oordeel dat de zogenaamde 'High Containment Unit' (HCU) van het CIDC waarin de aanvrager de experimenten met MKZV wil gaan uitvoeren, voldoet aan de eisen die de COGEM stelt voor een klasse 4 pathogeen. Daarnaast heeft, -voor zover bekend bij de COGEM -, de HCU een ML-III en DM-III status.

De COGEM merkt verder op dat geen enkel laboratorium in Nederland op dit moment de ML-IV status heeft. Verkrijgen van deze status is een tijdrovend en kostenintensief proces. De COGEM adviseert om de tweede optie voor inschaling van werkzaamheden met gg-MKZV, waarbij uitgegaan wordt van een ML-III status met gewijzigde en aanvullende voorschriften, toe te passen.

2.3 Bieden de voorgeschreven maatregelen ook in dit specifieke geval voldoende veiligheid?

Het ministerie heeft de COGEM gevraagd of zij van mening is dat voor deze specifieke vergunningaanvraag de in haar eerdere algemene advies gegeven voorschriften voldoende zijn om de milieuveiligheid te waarborgen. Daarnaast heeft het ministerie de verschillende stappen en onderdelen van de voorgenomen werkzaamheden ingeschaald en wil zij weten of de COGEM met deze inschaling kan instemmen.

Het ministerie heeft in haar voorstel tot inschaling de kloneringswerkzaamheden van MKZV genen in *E. coli*, ingeschaald op ML-I en de werkzaamheden met een volledige genomische MKZV kloon in *E. coli*, ingeschaald op ML-III (lid 1 en 2 voorstel tot inschaling).

MKZV is niet in staat tot replicatie in prokaryote systemen zoals *E. coli*. Ook kan expressie van MKZV eiwitten in *E. coli* uitgesloten worden. De transcriptie- en translatiesignalen van een eukaryootvirus worden niet herkend door de celmachinerie van de prokaryote bacterie. cDNA en gekloneerde genomdelen van het virus zijn niet infectieus. Dientengevolge lijken de voorgenomen kloneringswerkzaamheden geen risico's met zich mee te brengen en biedt ML-I voldoende inperking. Werkzaamheden met een genomische kloon, inclusief zuivering van het construct en transcriptie kan leiden tot de synthese van infectieus viraal RNA. Derhalve stemt de COGEM in met het inschalingsvoorstel ML-III (standaard of aangepast voor dierpathogenen conform COGEM advies CGM/060420-04 (1)).

De aanvrager is voorts van plan om delen van het MKZV genoom tot expressie te brengen in dierlijke primaire cellen afkomstig van rund, varken en schaap, teneinde de functie van de virale genen te kunnen onderzoeken. Het ministerie vraagt of de COGEM kan instemmen met het voorstel tot inschaling op ML-I niveau (lid 5 inschalingsvoorstel).

MKZV is een uiterst infectieus virus dat na infectie ernstige symptomen kan veroorzaken. Echter expressie van individuele genen of combinaties van genen van MKZV in een celsysteem onder weefselkweekcondities brengt naar de mening van de COGEM verwaarloosbare risico's voor mens of milieu met zich mee. Er kan geen infectieus virus gevormd worden omdat slechts een deel van het virale genoom aanwezig is. Er zijn geen rapporten bekend van schadelijke effecten van MKZV

gecodeerde eiwitten. Zelfs indien een MKZV-eiwit een schadelijk effect zou veroorzaken, blijft dit beperkt tot de cel waarin het construct tot expressie gebracht wordt. Het weefselkweekstelsel biedt voldoende inperking en bescherming voor de laboratoriummedewerker in het theoretische geval een toxine gevormd zou worden. Gezien het bovenstaande kan de COGEM instemmen met het voorstel tot inschaling op ML-I niveau.

De aanvrager is van plan om recombinante virussen te maken door genen van verschillende MKZV stammen uit te wisselen. De COGEM is van mening dat deze chimaere virussen geen hogere pathogeniteit of andere karakteristieken met verhoogd risico zullen hebben ten opzichte van de ouderstammen, aangezien er geen nieuwe eigenschappen of genen worden toegevoegd. De pathogeniteit e.d. van het chimaere virus zal zich binnen de bandbreedte bevinden van de karakteristieken van wildtype MKZ-virussen.

MKZV is geen pathogeen van de mens. In het verleden is infectie van mensen een aantal keer gerapporteerd. De beschreven symptomen zijn mild en bestaan uit hoofdpijn, (kortstondige) blaasvorming in mond, op handen of voeten (8). In hoeverre het hier daadwerkelijk MKZV infecties betreft, is onduidelijk. Mogelijk gaat het hier in een aantal gevallen om verwisseling met infecties met andere virussen zoals coxsackie A, herpes simplex of vesicular stomatitis. Daarnaast is ook weinig bekend over de immunstatus e.d. van de geïnficeerde personen. De geïnficeerde personen zouden in nauw en langdurig contact geweest zijn met geïnficeerde dieren (8,9). Het zou vooral de MKZV serotypen C en O betreffen. De laatste rapportages over infectie van laboratoriumpersoneel stammen uit de jaren zestig van de vorige eeuw. Onder meer zouden antilichamen tegen MKZV aangetoond zijn bij medewerkers van een vaccin productie unit (8). Bevestiging van eventuele MKZV-infecties met moderne diagnostische methoden ontbreken. Overdracht van mens naar mens is nooit aangetoond of gerapporteerd.

Gezien het feit dat de verschillende MKZV isolaten geen zoönotisch potentieel hebben, is de COGEM van mening dat uitwisseling van genen binnen MKZV geen verhoogd risico voor de mens met zich meebrengt. De voorgenomen werkzaamheden (kloneren en infectie van dierlijke cellen in weefselkweek) brengen geen bijzondere risico's met zich mee en zijn goed te controleren en in te perken.

De voorschriften die de COGEM in haar eerdere algemene advies heeft gesteld zijn gericht op bescherming van het milieu door verspreiding uit het gebouw, waarbinnen de werkruimte zich bevindt, te voorkomen (onderdruk, hepafilters in af- en aanvoerkanalen, desinfectie van werkoppervlakken etc). Hierbij zijn maatregelen gericht op de bescherming van de mens zoals die gehanteerd worden bij werkzaamheden met humane pathogenen niet noodzakelijk. Wel kan de mens mogelijk als verspreider optreden van het virus. Echter het douchen van de laboratoriummedewerkers, de wisseling van kleding en schoenen bij het verlaten van

het onderdrukruimte etc. en het feit dat de betrokken medewerkers minimaal drie dagen na de werkzaamheden niet in aanraking komen met MKZ-gevoelige dieren biedt voldoende waarborgen om verspreiding te voorkomen.

Gezien de aard van de werkzaamheden en het feit dat de chimaere virussen geen andere biologische eigenschappen zullen hebben als de wildtype ouderstammen is er ook geen noodzaak om ander werk- of inrichtingsvoorschriften te hanteren dan vermeld in het eerdere COGEM advies (1).

3. CONCLUSIE

De COGEM is van mening dat met de inschaling van de voorgenomen werkzaamheden met infectieus genetisch gemodificeerd MKZV op ML-III niveau met aanvullende en gewijzigde werk- en inrichtingsvoorschriften (zoals vermeld in bijlage 2 van het voorstel tot inschaling van het ministerie) de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is. De COGEM is tevens van mening dat ook bij de overige voorgestelde inschalingen en voorgestelde inperkingsmaatregelen de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

- 1) COGEM advies CGM/060420-04. Classificatie van dierpathogene virussen.
- 2) Van Regenmortel *et al.* (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic press, San Diego. USA
- 3) Grubman M. & Baxt B. (2004). Footh-and-mouth disease. Clin. Microbiol. Rev. **17**: 465-493
- 4) Knipe M. & Howley P. (2001). Fields virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA
- 5) Zibert A. *et al.*, (1990). Infectious footh-and-mouth-disease virus derived from a cloned full-length cDNA. J. Virol. **64**: 26467-2473.
- 6) Rieder E. *et al.*, (1993). Genetically engineered footh-and-mouth-disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. J. Virol. **67**: 5139-5145.
- 7) Liu G. *et al.*, generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. Vir. Res. **104**: 157-164
- 8) Bauer K. (1997). Footh-and-mouth disease as zoonosis. Arch. Virol. [suppl] **13**: 95-97.
- 9) Prempeh H. *et al.* (2001). Foot and mouth disease: the human consequences. BMJ **322**:565-566