



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

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

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
GGO 01-154/4.co1	8 april 2004	CGM/040427-01	29 april 2004
Onderwerp	Advies kennisgeving GGO 01-154/4		

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van kennisgeving GGO 01-154/4, getiteld 'Onderzoek naar het humaan metapneumovirus (hMPV)', van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, en het voorblad en voorstel tot inschaling dat door het Bureau GGO is opgesteld, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

Het humaan metapneumovirus (hMPV) is een bij de mens veel voorkomend verkoudheidsvirus dat door de COGEM geclassificeerd is als een pathogeniteitsklasse 2 virus (CGM/030205-01). Het doel van het experiment is het genereren van een specifiek antiserum tegen het hMPV in cavia's met het oog op het ontwikkelen van een vaccin. De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van de inperking van DM-III naar D-I diervverblijven van cavia's die zijn geïnfecteerd met wild-type hMPV dat geproduceerd is met behulp van moleculair biologische technieken.

De COGEM is van mening dat onder voorwaarden, zoals opgenomen in het voorstel tot inschaling van het ministerie van VROM, geïnfecteerde cavia's, en cavia's die een herinfectie met wild-type hMPV hebben ondergaan, van DM-III naar D-I inperkingsniveau teruggeplaatst kunnen worden. Deze aanvullende voorwaarden zijn dat de testuitslagen van PCR én viruskweek van minimaal drie opeenvolgende dagen negatief zijn voor hMPV. Hierbij dient getest te worden op monsters afkomstig uit de neus van alle cavia's uit dezelfde isolator. Het aanvullend voorschrift in het voorstel tot inschaling, dat dieren minimaal 14 dagen na infectie in onderdrukisolatoren moeten worden gehuisvest, is volgens de COGEM overbodig gezien het voorgaande voorschrift. Met inachtneming van de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Terugplaatsing van met recombinant humaan metapneumovirus geïnfecteerde cavia's

COGEM advies: CGM/040427-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de terugplaatsing van cavia's die intranasaal zijn geïnfecteerd met wild-type humaan metapneumovirussen (hMPV) van DM-III naar D-I inperkingsniveau nadat aangetoond is dat de dieren geen virus meer uitscheiden. De wild-type hMPV zijn geproduceerd met behulp van moleculair biologische technieken. Het doel van het onderzoek is het genereren van specifiek antiserum tegen het hMPV.

De COGEM heeft eerder een advies uitgebracht (CGM/011212-01) over handelingen met hMPV. Hierin werden werkzaamheden één inperkingsniveau hoger (DM-III) ingeschaald dan op basis van de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen verwacht mocht worden. Destijds betrof het handelingen met een relatief onbekend humaan metapneumovirus. Over de te ontwikkelen chimere recombinant virussen en de fenotypische eigenschappen hiervan was weinig bekend in de wetenschappelijke literatuur. Recentelijk zijn meer literatuurgegevens beschikbaar gekomen en heeft de COGEM het advies herzien (CGM/030205-01). In het herziene advies heeft de COGEM geadviseerd dat hMPV als een normaal verkoudheidsvirus beschouwd kan worden en geclassificeerd kan worden als een pathogeniteitsklasse 2 virus, waardoor een aantal handelingen lager ingeschaald konden worden. Gezien het feit dat in de huidige vergunning ook handelingen worden verricht met andere verwante virussen in verschillende diermodellen, zijn om praktische redenen alle dierexperimenten op hetzelfde inperkingsniveau (DM-III) ingeschaald. In de huidige aanvraag verzoekt de aanvrager om de met wild-type hMPV geïnfecteerde cavia's van DM-III niveau terug te plaatsen naar een lager inperkingsniveau, nadat is gebleken dat er geen uitscheiding van het virus meer plaatsvindt.

Humaan metapneumovirus

Het humaan *metapneumovirus* (hMPV) is een niet-gesegmenteerd negatief-strengig RNA virus met membraan. Het hMPV behoort tot de *Pneumovirinae* die worden onderverdeeld in de genera *Pneumovirus* en *Metapneumovirus*. Verwante virussen zijn *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), *Avian Pneumovirus* (APV) en *Parainfluenzavirus* (PIV). Al deze virussen behoren tot de familie van de paramyxovirussen. Zowel MPV, RSV, APV en PIV zijn virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (4).

De klinische symptomen van infectie met hMPV zijn vergelijkbaar met de symptomen die veroorzaakt worden door RSV (1; 7; 8). Deze variëren van milde

klachten van de bovenste luchtwegen tot ernstige bronchiolitis en pneumonie, vaak gepaard gaand met ernstig hoesten, spierpijn en braken. Beide infecties zijn endemisch en verspreiden zich voornamelijk door de lucht. Studies hebben aangetoond dat vrijwel alle kinderen in Nederland voordat zij de leeftijd van vijf jaar bereiken reeds geïnfecteerd zijn door hMPV en daardoor seropositief zijn (8). Herinfecties komen regelmatig voor en kunnen gepaard gaan met ziekteverschijnselen. Het virus infecteert met name kinderen op jonge leeftijd (0-2 jaar), individuen met een verzwakt immuunsysteem en bejaarden. Daarnaast is bekend dat het hMPV in de menselijke populatie al minstens 50 jaar circuleert (8). Het humane metapneumovirus kan derhalve beschouwd worden als een regulier verkoudheidsvirus dat vrijwel dezelfde ziekteverschijnselen als RSV veroorzaakt (1; 7; 8).

Adviesvraag

In de aanvraag zullen werkzaamheden verricht worden met humane metapneumovirussen die in diermodellen worden getest. De gebruikte virussen zijn vervaardigd met moleculair biologische technieken en zijn identiek aan wild-type hMPVs. De aanvrager verzoekt tot omlaagschaling van werkzaamheden met cavia's in associatie met recombinant hMPV zoals deze zijn vergund in beschikking GGO 01-154. In de huidige situatie vinden de handelingen met alle dieren uit dit project binnen hetzelfde inperkingsniveau plaats. Aangezien de capaciteit van de onderdrukisolatoren voor grootschalige, langdurige dierproeven niet toereikend is, wordt voorgesteld de dieren waarvan bewezen is dat ze geen infectieus virus meer uitscheiden, terug te plaatsen naar een lager inperkingsniveau. De aanvrager levert hiertoe gegevens die verschillende experimenten beschrijven waarmee het verloop van eventuele uitscheiding van het virus is vastgelegd. Voorgesteld wordt om de cavia's na aantoning van totale afwezigheid van het virus in de neus terug te plaatsen naar D-I inperkingsniveau. Opgemerkt dient te worden dat na terugplaatsing naar D-I niveau, de cavia's voor herinfectie met hMPV op DM-III gebruikt zullen worden, waarna wederom terugplaatsing naar D-I wordt beoogd.

Overwegingen

Detectiemethoden

In het inschalingsvoorstel dat opgesteld is door het ministerie van VROM wordt omschreven dat de met hMPV geïnfecteerde cavia's 14 dagen na infectie naar D-I niveau teruggeplaatst kunnen worden indien aan de hand van PCR en viruskweek aangetoond is dat er geen sprake meer is van uitscheiding van hMPV. De door de aanvrager geleverde gegevens beschrijven een 'pilot' experiment waarmee het verloop van uitscheiding van het virus is vastgelegd. In het betreffende experiment wordt de kinetiek van virale excretie aangetoond door middel van RT-PCR. De

detectielimiet van de gebruikte assay is ongeveer 50 genomische RNA moleculen/ml (3). De aanvrager geeft aan dat in een voorgaand experiment ook vanaf 10 dagen na infectie geen viraal RNA meer kan worden gedetecteerd in neus en keel van cavia's. Tevens wordt aangegeven dat in een eerder experiment vanaf dag 8 geen virus meer kon worden gekweekt. Aan de hand van viruskweek en een gevoelige gevalideerde PCR wordt aangetoond dat er in de dieren vanaf 11 dagen na infectie geen infectieus hMPV meer in de neus te detecteren is. Met behulp van de PCR methode worden virale sequenties aangetoond van zowel infectieus als niet-infectieus virus. Door de lagere detectielimiet van deze methode zal naar verwachting voor een langere tijd genetisch materiaal van het virus aangetoond worden dan met de kweektest. Door Vero cellen te kweken met virusisolaat zullen alleen infectieuze virusdeeltjes aangetoond worden. Uit literatuurgegevens blijkt dat deze methode niet optimaal is gezien het feit dat virusisolaten zeer moeizaam repliceren in Vero cellen (8).

Vanaf ongeveer een week na infectie kan al neutralisatie van infectieus virus optreden door mucosale antistoffen (5). Experimenteel onderzoek bij mens en dier naar respiratoire virusinfecties heeft aangetoond dat op een laat tijdstip na infectie nog wel enkele virusdeeltjes in neus en keel aanwezig kunnen zijn, maar dat er geen uitscheiding van infectieuze virusdeeltjes meer plaatsvindt (3; 6; 7; 9). Gezien het feit dat het gebruikte virus qua sequentie identiek is aan wild-type hMPV acht de COGEM de risico's op het ontstaan van gerecombineerde virussen als gevolg van recombinatie met verwante *Pneumovirinae* in cavia's niet groter dan in de natuur reeds voorkomt. De kans dat recombinatie tussen virussen optreedt, is afhankelijk van de mate van homologie tussen twee sequenties. Daarbij dient een cel geïnfecteerd te zijn met beide virussen.

De COGEM heeft de voorkeur om te spreken van "niet meer aantoonbaar" in plaats van "totale clearance" aangezien de PCR methode en de kweektest een bepaalde detectielimiet hebben. Hierdoor kan de absolute afwezigheid van virus niet worden bewezen, welke de term "totale clearance" wel suggereert. Samenvattend is de COGEM van mening dat het virus niet meer aantoonbaar aanwezig is indien de testuitslagen van de PCR analyse én de viruskweek negatief uitwijzen gedurende drie opeenvolgende dagen.

Aanvullende voorschriften

Een van de aanvullende voorschriften voor handelingen en huisvesting van hMPV geïnfecteerde cavia's luidt dat terugplaatsing van de dieren vanuit een isolator naar D-I alleen kan plaatsvinden bij negatieve testuitslagen. Dit betekent dat de testuitslag van een PCR én een viruskweektest van monsters afkomstig uit de neus van alle cavia's uit dezelfde isolator voor minimaal drie opeenvolgende dagen negatief is voor hMPV. Dit aanvullend voorschrift is ook van toepassing indien herinfectie van de dieren met hMPV heeft plaatsgevonden. Het hMPV is een virus van pathogeniteitsklasse 2 (CGM/030205-01). De enige excretieroute van het virus is via de respiratoire

route (9). De aanvrager geeft aan dat in andere experimentele infecties bij apen en muizen dezelfde distributie van het virus in het respiratoire weefsel is aangetoond en dat geen virus aangetoond is in overige organen. Het testen op afwezigheid van het virus wordt uitgevoerd met een gevalideerde PCR methode en viruskweektesten op Vero cellen (3; 8). Daarbij kan volgens de aanvrager hMPV in de neus van cavia's het langst worden aangetoond, mede gezien het feit dat het virus in de neus wordt toegediend. Op basis van bovengenoemde argumenten is de COGEM van mening dat de kans dat infectieus virus uitgescheiden wordt, nadat drie opeenvolgende dagen de testuitslagen negatief zijn, verwaarloosbaar klein is. Bij herinfectie kan aangenomen worden dat de excretie-periode zelfs korter is dan na de primaire infectie, aangezien een immuunrespons aanwezig is naar aanleiding van de eerste infectie. Deze immuunrespons zorgt ervoor dat het virus geneutraliseerd wordt (5).

Het eerste aanvullende voorschrift voor handelingen en huisvesting van cavia's luidt dat de dieren minimaal 14 dagen na infectie in onderdrukisolatoren gehuisvest dienen te worden. Het volgende aanvullend voorschrift geeft aan dat terugplaatsing van cavia's vanuit een isolator naar D-I kan plaatsvinden, wanneer met PCR en viruskweek van monsters uit de neus van alle cavia's uit dezelfde isolator, de testuitslag van minimaal drie opeenvolgende dagen negatief is voor hMPV. Dit kan derhalve betekenen dat bijvoorbeeld op dag 10 al voor drie opeenvolgende dagen bewijs is dat het virus niet meer aantoonbaar aanwezig is. Om de dieren dan toch 14 dagen in isolatoren te laten zitten zal de veiligheid voor mens en milieu niet significant vergroten. De COGEM is van mening dat het aanvullende voorschrift om dieren minimaal 14 dagen na infectie in onderdrukisolatoren te huisvesten overbodig is voor zowel infectie als herinfectie experimenten.

Tevens is de COGEM van mening dat, gezien het feit dat het om een pathogeniteitsklasse 2 virus gaat en het een wild-type virus betreft dat geproduceerd is door middel van moleculair biologische technieken, de handelingen op DM-II niveau, in plaats van DM-III niveau, kunnen plaatsvinden zonder dat daarbij de risico's voor mens en milieu toenemen (2).

Advies

De COGEM is van mening dat voldoende onderbouwd is dat het virus "niet meer aantoonbaar" aanwezig is in cavia's indien de testresultaten van zowel een viruskweek als PCR negatief zijn. De geïnfecteerde cavia's en de cavia's die een herinfectie hebben ondergaan kunnen van DM-III naar D-I inperkingsniveau teruggeplaatst worden. Voorwaarde is dat de testuitslagen van monsters afkomstig uit de neus van alle cavia's uit dezelfde isolator voor minimaal drie opeenvolgende dagen

negatief zijn voor hMPV. Het aanvullend voorschrift om dieren minimaal 14 dagen na infectie in onderdrukisolatoren te huisvesten is volgens de COGEM in het licht van het voorgaande aanvullende voorschrift overbodig. Met inachtneming van de aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Boivin, G., Abed, Y., Pelletier, G., Ruel, L., Moisan, D., Cote, S., Peret, T. C., Erdman, D. D., and Anderson, L. J. (2002). Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* **186**, blz. 1330-4
2. Integrale versie van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2003).
3. Maertzdorf, J., Wang, C. K., Brown, J. B., Quinto, J. D., Chu, M., de Graaf, M., van den Hoogen, B. G., Spaete, R., Osterhaus, A. D., and Fouchier, R. A. (2004). Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* **42**, blz. 981-6-981-6.
4. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
5. Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1996). Immunology. Mosby. London.
6. Shin, J. H. and Molitor, T. W. (2002). Assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA load in sera and tissues during acute infection. *J Vet Sci* **3**, blz. 75-86
7. Stockton, J., Stephenson, I., Fleming, D., and Zambon, M. (2002). Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* **8**, blz. 897-901
8. Van den Hoogen, B. G., de Jong, J. C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R. A., and Osterhaus, A. D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* **7**, blz. 719-24
9. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.