

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 29 februari 2012
KENMERK CGM/120229-01
ONDERWERP Advies: classificatie van het *Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 03-148/04 met de titel 'Cutaan humaan papillomavirus en oncogene transformatie' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee:

Samenvatting


De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van een nieuw ontdekt polyomavirus genaamd *Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus* (TSPyV) en werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg)-TSPyV.

TSPyV is een nieuw polyomavirus dat geassocieerd wordt met de ontwikkeling van de zeldzame huidaandoening trichodysplasia spinulosa (TS) in mensen met een sterk verzwakt immuunsysteem. Deze aandoening wordt gekarakteriseerd door de ontwikkeling van bultjes en langwerpige uitsteekseltjes op de huid en dan met name in het gelaat.

Onderzoek heeft uitgewezen dat de meerderheid van de wereldbevolking ooit geïnfecteerd is met TSPyV. Echter, de ziekte TS is tot op heden slechts bij een twintigtal patiënten beschreven. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de indeling van TSPyV in pathogeniteitsklasse 2 gerechtvaardigd.

De aanvrager wil het volledige genoom van TSPyV kloneren in *Escherichia coli* en vervolgens in verschillende dierlijke cellen tot expressie brengen. Vooralnog zal er geen verdere modificatie van het TSPyV genoom plaatsvinden.

Op grond van de inschaling van TSPyV in pathogeniteitsklasse 2 kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder het genoemde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-TSPyV 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. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Classificatie van het *Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*

COGEM advies CGM/120229-01

Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijziging van vergunning IG 03-148 met de titel 'Cutaan humaan papillomavirus en oncogene transformatie'. Het wijzigingsverzoek betreft onderzoek naar de replicatie en *in vitro* pathogeniteit van een nieuw ontdekt humaan polyomavirus genaamd *Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus* (TSPyV). De aanvrager heeft al een vergunning voor expressie van individuele genen van humaan papillomavirus en humane en animale polyomavirussen. De aanvrager wil het volledige genoom van TSPyV kloneren en *in vitro* bestuderen op infectiviteit, replicatie en pathogeniteit. Vooral nog zal er geen verdere modificatie van het TSPyV genoom plaatsvinden. De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het TSPyV en de inschaling van werkzaamheden met gg-TSPyV.

Polyomaviridae

TSPyV behoort tot de familie van de *Polyomaviridae*. De *Polyomaviridae* is een familie van kleine DNA-virussen die verschillende zoogdieren en vogels kunnen infecteren. Recent is door de *Polyomaviridae* Study Group van het International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) voorgesteld de familie, die momenteel uit het enkele genus *Polyomavirus* bestaat, op te delen in drie genera bestaande uit virussen die zoogdieren infecteren en virussen die vogels infecteren.¹ Volgens het voorstel komen er twee zoogdiergenera genaamd *Orthopolyomavirus* en *Wukipolyomavirus* en een aviair genus genaamd *Avipolyomavirus*.

Bij de mens zijn tot op heden negen verschillende polyomavirussen beschreven, waaronder het *BK polyomavirus* (BKPyV), *JC polyomavirus* (JCPyV), *KI polyomavirus* (KIPyV), *WU polyomavirus* (WUPyV), *Merkel cell polyomavirus* (MCPyV), *Human polyomavirus type 6*, *Human polyomavirus type 7*, *Human polyomavirus type 9* (HPV6, HPV7 en HPV9) en het *Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus* (TSPyV).^{1,2,3,4} Naast deze negen polyomavirussen wordt ook het primatenpolyomavirus *Simian virus 40* (SV40) in mensen aangetroffen.⁵

Infecties met polyomavirussen verlopen doorgaans asymptomatisch en resulteren in een levenslange latente aanwezigheid van het virus. In patiënten met een ernstig verzwakt afweersysteem kan een infectie symptomatisch worden.⁶ Het BKPyV kan bijvoorbeeld nefropathie veroorzaken in patiënten die een niertransplantatie hebben ondergaan.¹ Het JCV kan in sterk immuungecompromiteerde patiënten progressieve multifocale leuko-encefalopathie veroorzaken door de afbraak van oligodendrocyten in het centrale zenuwstelsel.¹

Genomische organisatie van de Polyomaviridae

Het genoom van de *Polyomaviridae* is een circulair, dubbelstrengs DNA molecuul van ongeveer 5.000 basenparen. Het genoom bevat een zogenoemde 'noncoding control region' (NCCR) bestaande uit een 'origin of replication' en een 'transcription control region.' Aan de tegengestelde zijden van de NCCR bevinden zich de vroege en late regionen die voor de vroege eiwitten en late eiwitten coderen.^{1,2} Tijdens de vroege fase van de virale levenscyclus (voorafgaand aan DNA replicatie) komen het zogenoemde 'large T antigen' en 'small t antigen' tot expressie. Deze niet-structurele eiwitten zijn essentieel voor de virale replicatie en transcriptie van de verschillende mantel-eiwitten genaamd VP1, VP2 en VP3.¹ Daarnaast brengen sommige polyomavirussen nog het zogenoemde *agnoprotein* tot expressie. De functie van dit niet-structurele eiwit is tot op heden nog niet bekend.¹

De T-antigenen ontleen hun naam aan het feit dat zij de celcyclus van geïnfecteerde cellen verstoren en deze cellen in sommige gevallen kunnen transformeren wat mogelijk kan leiden tot tumorformatie.^{1,2}

Trichodysplasia spinulosa

Het TSPyV is recent ontdekt en geïsoleerd uit een patiënt met de zeldzame huidaandoening trichodysplasia spinulosa (TS). Deze huidaandoening wordt zowel waargenomen bij patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan als bij leukemiepatiënten die immunosuppressieve medicatie hebben ontvangen. De patiënt in kwestie had eerder een harttransplantatie ondergaan.³

TS wordt gekarakteriseerd door de ontwikkeling van bultjes en langwerpige, uit keratine bestaande uitsteekseltjes op de huid. Deze beschadigingen zijn het meest opvallend op de neus, wenkbrauwen en oorschelpen, maar ook andere delen van het lichaam kunnen aangedaan zijn. De aandoening gaat gepaard met een verdikking van de huid en het uitvallen van de wenkbrauwen.³

Recent serologisch onderzoek heeft uitgewezen dat TSPyV een seroprevalentie van ongeveer 70% heeft onder de algemene bevolking en 89% in patiënten met een verzwakt afweersysteem.⁷ Ondanks deze hoge seroprevalentie is de ziekte wereldwijd slechts bij een twintigtal patiënten beschreven.^{6,8}

De natuurlijke verspreidingsroute van TSPyV is nog onbekend, maar gezien het grote aantal virusdeeltjes dat gemeten is in TS wondjes en elders op de huid van TS patiënten, is het volgens de aanvrager aannemelijk dat direct contact een potentiële verspreidingsroute is.

Voorgenomen werkzaamheden

Om inzicht te krijgen in de replicatie en pathogeniteit van het TSPyV wil de aanvrager het volledige genoom van TSPyV in *Escherichia coli* kloneren en gebruiken voor de transfectie van verschillende animale cellen in combinatie met een GFP-reporter construct. De getransfecteerde cellen worden getest op aanwezigheid van viraal DNA, viraal mRNA en eiwitexpressie via respectievelijk PCR, RT-PCR, Westernblot en Immuno Fluorescentie Assay (IFA). De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitvoeren.

Pathogeniteitsklassen

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Derhalve is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.⁹ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
 - o het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
 - o het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
 - o 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;
 - o van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft twee keer eerder geadviseerd over werkzaamheden met polyomavirussen. In 2001 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met deletiemutanten van het *Aviair*

polyomavirus (APyV).¹⁰ De COGEM was destijds van mening dat er geen aanwijzingen zijn dat het APyV pathogeen is voor de mens. Daarom is het virus ingedeeld als klasse 2 dierpathogeen.

De COGEM heeft in 2007 advies uitgebracht over de classificatie van enkele nieuw ontdekte primaten polyomavirussen.¹¹ Ook heeft zij geadviseerd over de inschaling van de klonering van de complete virale genomen en de productie en karakterisatie van deze polyomavirussen in animale cellen. De COGEM heeft destijds de door de aanvrager ontdekte primatenpolyomavirussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Daarnaast adviseerde de COGEM de voorgenomen productie en werkzaamheden met de polyomavirussen in te schalen op ML-II niveau.

Overweging en advies

Classificatie TSPyV

TSPyV is een nieuw polyomavirus dat geassocieerd wordt met de ontwikkeling van de zeldzame huidaandoening trichodysplasia spinulosa. Deze huidaandoening komt alleen voor bij sterk immuungecompromiteerde patiënten. Serologisch onderzoek heeft aangetoond dat de meerderheid van de wereldbevolking geïnfecteerd is met het virus, terwijl TS tot op heden slechts bij een twintigtal patiënten beschreven is. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de indeling van TSPyV in pathogeniteitsklasse 2 gerechtvaardigd.

Werkzaamheden met TSPyV

De aanvrager wil het volledige genoom van TSPyV kloneren in *E. coli* en gebruiken voor de transfectie van verschillende animale cellen in combinatie met een GFP-reporter construct. Vooralsnog zal er geen verdere modificatie van het TSPyV genoom plaatsvinden.

Tijdens de werkzaamheden zullen onder andere cellen worden gebruikt die stabiel getransfecteerd zijn met het small en/of large T-antigen van *Merkel cell polyomavirus* of cellen die delen van het primatenpolyomavirus SV40 bevatten. Een mogelijk risico bij transfectie van het TSPyV genoom in deze cellen is het ontstaan van een recombinant TSPyV. Theoretisch gezien is de kans op recombinatie aanwezig gezien de verwantschap van de polyomavirussen. Er zou bijvoorbeeld een recombinant kunnen ontstaan waarbij de manteleiwitten van TSPyV zijn vervangen door die van SV40. In dat geval zou de immuniteit in de humane populatie gering zijn, waardoor het virus zich in theorie makkelijker zou kunnen verspreiden.

Tot op heden is recombinatie tussen polyomavirussen in de wetenschappelijke literatuur nog nooit beschreven. Daarnaast is SV40 niet-pathogeen voor de mens en veroorzaakt het ook geen letaliteit in zijn natuurlijke gastheer. Het virus wordt op de Belgian Biosafety Server en door de Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{12,13} In de ogen van de COGEM zijn er geen redenen om aan te nemen dat het ziekteverwekkende vermogen van het laag-pathogene gg-TSPyV in combinatie met SV40 toeneemt.

De natuurlijke verspreidingsroute van TSPyV is nog niet bekend. De aanvrager geeft aan dat direct contact een potentiële verspreidingsroute is. Daarnaast is niet uit te sluiten dat verspreiding

door droplets via speeksel, keel en luchtwegen of uitscheiding van virusdeeltjes via feces of urine plaatsvindt. Gezien de mogelijke verspreidingsroutes vindt de COGEM dat open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. Daarnaast is het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden verplicht.

Op grond van de inschaling van TSPyV in pathogeniteitsklasse 2 kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met gg-TSPyV op ML-II inperkingsniveau. Onder dit inperkingsniveau en de aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-TSPyV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Johne R *et al.* (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. Arch Virol. 156: 1627-1634
2. Moens U *et al.* (2011). Human polyomaviruses in skin diseases. Patholog Res Int. 2011: 123491
3. van der Meijden E *et al.* (2010). Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog. 29: 6 e1001024
4. Kazem S *et al.* (2012). Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. J Clin Virol 53: 225-230
5. Moens U *et al.* (2007) Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins. Cell. Mol. Life Sci. 64: 1656-1678
6. Kazem S *et al.* (2012). Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. J Clin Virol 53: 225-230
7. van der Meijden E, et al. (2011). Seroprevalence of Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus. Emerg Infect Dis. 17: 1355-1363
8. Matthews MR *et al.* (2011). Viral-associated trichodysplasia spinulosa: a case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. J Cutan Pathol. 38: 420-431
9. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
10. COGEM (2001). Deleties van het aviair polyomavirus (APV) als vaccin tegen ziektes veroorzaakt door dit virus. Advies CGM/010413-03
11. COGEM (2007). Replicatie en transformatie eigenschappen van nieuwe primaten polyomavirussen. Advies CGM/071127-01
12. Belgian Biosafety Server http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (23-02-12)
13. Zentrale Kommission fur die Biologische Sicherheit. www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/register_datenbanken/organismenliste.pdf?__blob=publicationFile&v=4 (23-02-12)