

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 21 december 2012
KENMERK CGM/121221-01
ONDERWERP Advies: Inschaling werkzaamheden met Hepatitis E virus

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 12-090 met de titel 'Modeling Hepatitis E virus infection' van het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee:


Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis E virus* (HEV). Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)HEV. In patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan, kan een HEV infectie ernstige gevolgen hebben. De aanvrager wil een kweekstelsel ontwikkelen om het effect van verschillende afweeronderdrukkende medicijnen op het HEV-infectieproces te evalueren en karakteriseren.

Er bestaan vier verschillende HEV genotypen. Het HEV1 en HEV2 komen uitsluitend voor bij mensen en worden verspreid via besmet water. HEV3 en HEV4 hebben een breder gastheerbereik en komen vooral voor bij dieren. Mensen zijn te beschouwen als incidentele gastheer van deze virussen. De aanvrager zal voor zijn werkzaamheden gebruik maken van volvirulente HEV3 virusdeeltjes en op HEV3 gebaseerde replicons. Deze replicons kunnen zich in zoogdiercellen vermenigvuldigen maar vormen geen infectieuze deeltjes.

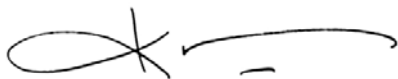
HEV 3 geeft een mild ziektebeeld en is endemisch in Nederland aanwezig. Gezien de orale transmissie route en er geen transmissie van mens tot mens wordt waargenomen, acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat HEV3 zich zal verspreiden onder de bevolking. Op basis van deze eigenschappen adviseert de COGEM HEV3 in pathogeniteitsklasse 2 in te schalen.

Gebaseerd op bovenstaande classificatie adviseert de COGEM de kloneringswerkzaamheden en de werkzaamheden met de HEV3 gebaseerde replicons op ML-I inperkingsniveau uit te voeren. Voor de werkzaamheden met infectieuze volvirulente HEV3 deeltjes adviseert de COGEM een ML-II inperkingsniveau. Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van enkele aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's verbonden aan 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. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Classificatie van *Hepatitis E virus* en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HEV

COGEM advies CGM/121221-01

Inleiding

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis E virus* (HEV) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)HEV. De aanvrager, het Erasmus MC wil een *in vitro* systeem ontwikkelen om het effect van verschillende immuunsuppressiva op het replicatieproces van HEV te evalueren. Dit onderzoek kan volgens de aanvrager bijdragen aan de behandeling van HEV-geïnfecteerde orgaantransplantatiepatiënten.

Hepatitis E virus

Het HEV is een positief-strengig RNA virus behorend tot het genus *Hepevirus* in de familie *Hepeviridae*.¹ Er zijn vier genotypen HEV te onderscheiden die allen behoren tot een enkel serotype. HEV genotype 1 en 2 (resp. HEV1 en HEV2) komen uitsluitend voor bij mensen.^{1,2} HEV3 en HEV4 hebben een breder gastheerbereik en kunnen zowel mensen als zoogdieren infecteren.^{1,2} Potentiële dragers van HEV3 en HEV4 zijn varkens, herten en wilde zwijnen.^{3,4}

HEV1 en 2 worden alleen aangetroffen in ontwikkelingslanden en zijn endemisch in grote delen van Azië, Afrika en Latijns-Amerika. De hoogste infectiepercentages komen voor in gebieden met slechte sanitaire voorzieningen en een lage sociaal-economische status van de bevolking.² Transmissie vindt plaats via inname van met feces besmet water. Deze HEV genotypen worden aangetroffen in incidentele gevallen maar kunnen ook leiden tot een epidemie. Veelal veroorzaakt een infectie een asymptomatische of milde (acute) hepatitis waar doorgaans geen behandeling voor nodig is.^{4,5} Gedurende een epidemie overlijdt 0.2 tot 4% van de geïnfecteerde individuen. In kinderen onder de twee jaar is sterftepercentage hoger. Opvallend is het feit dat het ziekteverloop ernstiger is in zwangere vrouwen en het sterftepercentage in deze bevolkingsgroep oploopt tot 25%.^{2,4} Dit wordt met name gezien als gevolg van een infectie met HEV1.^{3,4} Sterfte treedt voornamelijk op in het derde trimester en wordt veroorzaakt door ernstig leverfalen en obstetrische complicaties, zoals bloedingen en eclampsie. Ook bij personen met een chronische leverziekte of een sterk verzwakt immuunsysteem kan een ernstiger ziektebeeld optreden met dodelijke gevolgen.

HEV3 en 4 worden zowel in ontwikkelingslanden als in ontwikkelde landen aangetroffen en zijn verantwoordelijk voor incidentele gevallen van hepatitis. Deze infecties zijn vermoedelijk het gevolg van de consumptie van rauw of slecht gebakken vlees van varkens of wild.^{3,4} HEV3 kent een wereldwijde distributie.⁴ HEV4 kwam tot voor kort alleen in ZuidOost Azië voor, maar is recentelijk is ook aangetoond in Europese varkens en mensen.^{6,7} Op basis van een recente studie onder bloeddonoren in Engeland blijkt 10% seropositief voor HEV.⁸ Een acute HEV3 of HEV4 infectie duurt ongeveer 4-6 weken, is in de meeste gevallen asymptomatisch en gaat vanzelf

over. In tegenstelling tot HEV1 worden HEV3 en 4 niet geassocieerd met een verhoogde sterfte onder zwangere vrouwen.⁴ In immuungecompromiteerde individuen of mensen met HIV kan HEV3 leiden tot een chronische infectie. Virustransmissie van mens op mens is onwaarschijnlijk.

Genomische organisatie van HEV

HEV is een positief-strengig RNA virus. Het genoom van dit virus bevat drie deels overlappende 'open reading frames' (ORFs).⁹ Het eerste ORF, ORF1 codeert voor verschillende niet-structurele eiwitten, waaronder methyltransferase, protease, RNA helicase en RNA polymerase.^{1,9} ORF2 codeert voor een viraal manteleiwit dat verantwoordelijk is voor het inpakken van het RNA genoom in het virusdeeltje en voor de binding van het virus aan de gastheer cel.⁹ ORF3 overlapt met ORF2 en codeert voor een eiwit dat betrokken is bij de pathogenese van het virus door onder andere bevordering van celsurvival en immunosuppressie.²

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil volvirulente HEV3 deeltjes en op HEV3 gebaseerde replicons produceren. Daarvoor worden respectievelijk de constructen HEV-p6 en HEV-p6-Luc gegenereerd. Het eerste construct bevat het complete genoom van het HEV3. Het andere construct bevat alleen het ORF1 domein van het HEV3 genoom. Het oorspronkelijk aanwezige ORF2/3 domein is in dit construct vervangen door het *Gaussia* luciferase reporter gen. De volvirulente HEV3 deeltjes worden geproduceerd door gastheercellen te transduceren met *in vitro* gesynthetiseerd RNA dat afkomstig is van HEV-p6. Op identieke wijze worden met behulp van HEV-p6-Luc de op HEV3 gebaseerde replicons geproduceerd. De aanvrager geeft aan dat er door de afwezigheid van ORF2 geen infectieuze virusdeeltjes gevormd kunnen worden. Het replicon zal echter wel vermeerderd worden in de gastheer cel. Door expressie van het luciferase gen kan de replicatie door middel van luminiscentiemetingen gevolgd worden.

Classificatie

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.¹⁰ 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;

- het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
 - 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;
 - 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.

Door de ‘Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit’ en de ‘Belgian Biosafety Server’ wordt HEV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.^{11,12} Door de ‘Public Health Agency of Canada’ wordt HEV geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.¹³ In Amerika mogen werkzaamheden met het virus volgens het Centre for Disease Control and Prevention onder BSL-2 condities plaatsvinden.¹⁴ De COGEM heeft het HEV nog niet eerder geclassificeerd.

Overweging en advies

Classificatie van HEV3 en HEV4

In de Verenigde Staten en Canada wordt HEV geclassificeerd als een Risk Group 2 pathogeen. In Duitsland en België wordt HEV beschouwd als Risk Group 3 pathogeen. Hierbij merken deze landen op dat HEV een beperkt infectierisico heeft doordat het zich niet aerogeen verspreidt.

Zoals boven is aangegeven, wordt in Nederland de pathogeniteit van micro-organismen bepaald op basis van de aard van de ziekte, de verspreiding onder de bevolking en de aanwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling. In Nederland komt HEV3 algemeen voor in varkens en kan worden beschouwd als een endemisch virus. Mensen zijn te beschouwen als incidentele gastheer van dit virus. Besmetting kan optreden door het consumeren van rauw of niet goed doorbakken vlees. Aerogene verspreiding vindt niet plaats en tot op heden is nooit melding gemaakt van transmissie van mens op mens.

Infectie van gezonde individuen met HEV3 veroorzaakt een asymptomatische of milde ontsteking in de lever. De ziekte is zelf-beperkend en behoeft geen behandeling. Er bestaat geen profylaxe in de vorm van een vaccin tegen HEV3. De COGEM merkt hierbij echter op dat door eenvoudige preventieve maatregelen, zoals het naleven van standaard hygiëneregels en goede verhitting van vlees voor consumptie een besmetting met dit virus voorkomen wordt. Gezien bovenstaande overweging adviseert de COGEM HEV3 in pathogeniteitsklasse 2 in te schalen.

De vergunningaanvraag is beperkt tot het gebruik van HEV3. De COGEM is echter ook gevraagd te adviseren over de classificatie van de genotypen HEV1, HEV2 en HEV4. Met het oog op de grote overeenkomsten tussen HEV3 en HEV4, is de COGEM van mening dat HEV4 tot dezelfde pathogeniteitsklasse gerekend kan worden als HEV3.

De overeenkomsten met HEV1 en 2 acht de COGEM echter minder evident. De HEV genotypen 1 en 2 zijn endemisch in ontwikkelingslanden en worden niet aangetroffen in Europa. Ze zijn geadapteerd aan de mens, komen in ontwikkelingslanden in grote delen van de bevolking voor en worden niet aangetroffen in dieren. Een infectie met HEV1 leidt tot een relatief hoog sterftepercentage onder zwangere vrouwen. Op basis van deze gegevens en de aangeleverde literatuur is de COGEM van mening dat HEV genotype 1 en 2 niet eenduidig te classificeren zijn. Om tot een goed onderbouwd oordeel te kunnen komen, acht zij nader onderzoek noodzakelijk. Dit onderzoek en de classificatie van deze twee genotypen zal zij in het kader van de voorgenomen herziening van de virusclassificatie ter hand nemen.

Inschaling van de werkzaamheden

De aanvrager wil zowel niet-infectieuze op HEV3 gebaseerde replicons produceren als volvirulente HEV3 deeltjes. Daarvoor worden twee verschillende constructen gegenereerd: HEV-p6-Luc en HEV-p6. Het eerste construct bevat alleen het ORF1 domein van het HEV genoom. Het oorspronkelijk aanwezige ORF2/3 domein van het HEV genoom is in dit construct vervangen door het *Gaussia* luciferase gen. Het andere construct bevat het complete genoom van het HEV3. Beide constructen worden geproduceerd in *E. coli*. Tijdens de kloneringswerkzaamheden komen er geen virale eiwitten tot expressie en worden er geen infectieuze virusdeeltjes geproduceerd. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de kloneringswerkzaamheden op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden.

Door transfectie van animale cellen met *in vitro* gesynthetiseerd viraal RNA van het eerste construct beoogt de aanvrager de virusrelicatie na te bootsen. Hij geeft daarbij aan dat door verwijdering van het ORF2/3 domein er geen infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan. Mede op basis van de studie van Graff *et al.* beaamt de COGEM dat ORF2 essentieel is voor de vorming van infectieuze virusdeeltjes en acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat er na transfectie van HEV-p6-Luc infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan.¹⁵ Derhalve adviseert zij de werkzaamheden met HEV-p6-Luc in combinatie met animale cellen op inperkingsniveau ML-I in te schalen. De COGEM wijst hierbij overigens wel op het belang dat het ORF2/3 domein niet kan worden gecompenseerd door bijvoorbeeld een contaminatie van de celkweek met

wildtype HEV. Om dit te minimaliseren is de COGEM van mening dat de animale cellen gecontroleerd moeten zijn op de aanwezigheid van wildtype HEV.

Indien animale cellen getransfecteerd worden met het construct waarin het volledige genoom van het HEV3 gekloneerd is, zijn alle elementen aanwezig om volvirulent HEV te produceren. De aanvrager verwacht ook dat volvirulent HEV zal ontstaan. Conform de indeling van het HEV3 in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM deze werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II in te schalen. Met het oog op de transmissieroute, de mogelijke verhoogde pathogeniteit in enkele specifieke individuen en ter voorkoming van een ongewenste infectie van medewerkers met HEV3, adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- medewerkers die zwanger of immuungecompromiteerd zijn, zijn uitgesloten van deze activiteiten.

De COGEM is van mening dat onder bovengenoemde inperkingsniveau's en door het hanteren van de aanvullende voorschriften de risico's van voorgenomen handelingen met gg-HEV virusdeeltjes en HEV-gebaseerde replicons voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Meng XJ *et al.* (2012). Family *Hepeviridae*. In: Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Edited by: King AMQ *et al.* San Diego, Elsevier Academic Press: 1021-1028
2. Chandra V *et al.* (2008). Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J. Biosci.* 33: 451-464
3. Hoofnagle JH *et al.* (2012). Hepatitis E. *N Engl J Med.* 27: 1237-44.
4. Kamar *et al.* (2012). Hepatitis E. *Lancet.* 379: 2477-2488
5. Purdy MA & Khudyakov YE (2011). The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 161: 31-39
6. Hakze-van der Honing R *et al.* (2001). First isolation of Hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS ONE.* 6:e22673
7. Colson P *et al.* (2012). Autochthonous infections with Hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1361-1364
8. Beale MA *et al.* (2010). Is there evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors? *Vox Sanguinis* 100: 340-342
9. Ahmad I *et al.* (2011). Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 161:47-58
10. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
11. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2009). Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. http://www.opbw.org/nat_imp/leg_reg/germ/Org_GeneticWork.pdf (20 december 2012)

12. Belgian Biosafety Server http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (20 december 2012)
13. Public Health Agency of Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/hepe-eng.php> (20 december 2012)
14. Centers for disease control and prevention http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_VIII_e.pdf (20 december 2012)
15. Graff J. *et al.* (2008). Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of Hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J. Vir.* 82: 1185-1194