

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

**DATUM** 02 mei 2013  
**KENMERK** CGM/130502-01  
**ONDERWERP** Advies: Inschaling werkzaamheden met *gg-Huaiyangshan virus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag met de titel 'Huaiyangshan virus reverse-genetics' van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Huaiyangshan virus* (HYSV). De aanvrager wil infectieuze zich niet verspreidende HYSV deeltjes produceren en onderzoeken ten behoeve van de ontwikkeling van vaccins en antivirale therapie. De COGEM is verzocht ook te adviseren over de inschaling van deze werkzaamheden.

In de natuur vindt infectie met HYSV vermoedelijk plaats via een tekenbeet. Het is niet uitgesloten dat contact van de intacte huid of slijmvliezen met weefsels, bloed of andere lichaamsvloeistoffen van een geïnfecteerd persoon ook kan leiden tot infectie. Dieren worden over het algemeen niet ziek van een infectie met HYSV. Het HYSV veroorzaakt in de mens een zeer ernstige ziekte waaraan 12-16% van de gehospitaliseerde patiënten overlijdt. Een effectieve behandeling is niet beschikbaar. Op basis van bovenstaande gegevens en het feit dat er nog veel onbekend is over HYSV is de COGEM van mening dat het HYSV in de hoogste pathogeniteitsklasse (PG4) moet worden ingedeeld.

De klonering van delen van het genoom van HYSV en de expressie van antigene HYSV eiwitten adviseert de COGEM op ML-I in te schalen. Werkzaamheden met infectieuze zich niet verspreidende HYSV deeltjes adviseert de COGEM op ML-III inperkingsniveau in te schalen onder toevoeging van enkele aanvullende voorschriften. Bij uitvoering van werkzaamheden op genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenoemde werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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 belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Huaiyangshan virus

## COGEM advies CGM/130502-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse het *Huaiyangshan virus* (HYSV) ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met (delen van) HYSV genoomsegmenten en infectieuze, zich niet verspreidende, HYSV deeltjes (replicons).

#### 1.1 *Huaiyangshan virus*

Het *Huaiyangshan virus* is ook bekend als het *Severe fever thrombocytopenia syndrome virus* (SFTSV) of het *Henan fever virus*. In 2009 werd een patiënt beschreven met symptomen die lijken op hemorragische koorts. In 2011 bleek dat het HYSV de oorzaak van de ziekte was. Het virus is behalve in de mens ook aangetroffen in gedomesticeerde dieren zoals schapen, geiten, runderen, varkens, honden en kippen.<sup>1</sup> Bij dieren zijn geen ziekteverschijnselen bekend ten gevolge van een infectie met het HYSV, maar bij de mens kan onder meer koorts, trombocytopenie, leukopenie en verstoring van de vitale functies optreden. In ernstige gevallen kan een HYSV infectie resulteren in meervoudig orgaanfalen en hemorragische manifestaties. Tot dusver zijn ruim 500 gevallen bekend van humane infecties met HYSV, alle beperkt tot China. Van de patiënten die opgenomen zijn met deze symptomen is 12-16% overleden. Er bestaan nog geen medicijnen of vaccins tegen HYSV.<sup>2,3,4</sup>

HYSV is aangetroffen in de teken *Haemaphysalis longicornis* en *Rhipicephalus microplus*.<sup>4</sup> Deze teken komen niet in Nederland voor. De natuurlijke gastheer van het virus is nog niet vastgesteld. Over de infectieroute van het virus is nog weinig bekend. Hoogstwaarschijnlijk vindt infectie van de mens plaats door een beet van een HYSV-positieve teek. In verschillende artikelen wordt overdracht van HYSV van mens-tot-mens door bloedcontact gerapporteerd.<sup>5,6,7,8,9</sup> Er zijn geen aanwijzingen voor aëroge transmissie.

#### 1.2 *Genomische organisatie van HYSV*

Het *Huaiyangshan virus* behoort tot het genus *Phlebovirus* van de *Bunyaviridae* familie. Het genus *Phlebovirus* bevat tot dusver twee groepen, te weten *Phlebotomus fever* groep (waaronder *Rift Valley fever virus* (RVFV)) en Uukuniemi groep.<sup>10</sup> Op basis van fylogenetisch onderzoek lijkt HYSV tot een derde en tot nog toe onbekende groep binnen het genus te behoren.<sup>4</sup>

HYSV is een enkelstrengs (-) RNA virus met een genoom dat bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment. Het S-genoomsegment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de genoomsegmenten het zogenaamde 'nucleocapside'. Daarnaast codeert het S-genoomsegment voor het niet-structurele eiwit NSs. De exacte functie van NSs in HYSV is niet duidelijk, in RVFV is NSs betrokken bij blokkering van interferon genexpressie. Het M-genoomsegment codeert voor de glycoproteïnen Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden. Deze interactie faciliteert de opname van het virus in de cel.

Het L-genoomsegment codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese. Aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten van HYSV bevinden zich sequenties die niet coderen voor een eiwit, de zogenaamde 'untranslated regions' of UTRs. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTRs verschillend in lengte en nucleotidenvolgorde. De UTRs zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.

### **1.3 Classificatie in andere landen**

In de Regeling ggo worden 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.<sup>11</sup> Deze indeling wordt bepaald op basis van de aard van de ziekte, de verspreiding onder de bevolking en de aanwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling.

Het HYSV is in Nederland nog niet geclassificeerd. Andere organisaties hebben HYSV ingeschaald als klasse 3 (Health and Safety Executive (HSE)) en klasse 4 (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)).<sup>12,13</sup>

## **2. De voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is van plan met behulp van 'reverse genetics' infectieuze defectieve HYSV virusdeeltjes (replicons) van HYSV te produceren en deze *in vitro* te gebruiken voor fundamenteel onderzoek en het ontwikkelen van vaccins en antivirale therapieën. Deze replicons zullen maximaal twee van de drie genoomsegmenten van HYSV bevatten. Hierdoor wordt volgens de aanvrager de kans op het ontstaan van volvirulent HYSV geminimaliseerd, omdat niet al het coderende RNA van het virus in de replicons aanwezig is.

De structurele eiwitten van HYSV, Gn en Gc, zullen (stabiel) in 'baby hamster kidney' cellen (of vergelijkbare cellen) getransfecteerd worden. De coderende sequentie voor deze genen is aanwezig in een codon-geoptimaliseerd expressieplasmide, kan door het ontbreken van de UTR's niet repliceren en niet worden ingepakt in nieuwe virusdeeltjes. Voor de productie van HYSV replicons worden de cellen geïnfecteerd met een recombinant fowlpox virus dat T7 polymerase tot expressie brengt. Na een incubatieperiode worden vervolgens twee transcriptieplasmiden getransfecteerd. De eerste is een plasmide dat codeert voor het HYSV S segment. De aanvrager wil drie verschillende varianten van dit S segment gebruiken; wildtype, één waar NSs vervangen is door een fluorescent reportereiwit en één waar NSs is vervangen door een luciferase reportereiwit. Het tweede is een plasmide dat codeert voor het L segment. De HYSV genoomsegmenten L en S zullen vervolgens ingepakt worden in deeltjes die Gn en Gc op de oppervlakte hebben.

## **3. Eerder advies**

Werkzaamheden met HYSV replicons of genoomsegmenten zijn nog niet eerder beoordeeld en vergund in Nederland. In 2011 en 2012 heeft de COGEM geadviseerd over vergelijkbare werkzaamheden met de bunyavirussen RVFV en *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* die zijn ingeschaald in klasse 3 en 4. Hierbij was eveneens sprake van het gebruik van maximaal twee complete genoomsegmenten bij de productie van replicons.<sup>14,15</sup> De COGEM was van mening dat de productie van replicons kan plaatsvinden op ML-III niveau met enkele aanvullende voorschriften.

## **4. Overweging**

### **4.1 Classificatie van HYSV**

Het HYSV kan een ernstige ziekte veroorzaken, met een gemiddelde mortaliteit van 12-16% van de gehospitaliseerde gevallen. Het virus wordt voor zover bekend overgedragen via een beet van een teek, maar contact van de (intacte) huid of slijmvlies met weefsel of lichaamsvloeistoffen van besmette mensen en dieren kan ook tot een infectie met het HYSV leiden. Er zijn geen aanwijzingen voor äerogene transmissie, maar verspreiding via fomites kan volgens de COGEM niet uitgesloten worden. Op dit moment is er nog geen effectieve behandeling of vaccin beschikbaar.

### **4.2 Klonering van delen van HYSV genoom in *E. coli***

De aanvrager is van plan individuele genen of volledige individuele genoomsegmenten van het HYSV te kloneren in *E. coli*. Bij deze klonering zullen de drie volledige genoomsegmenten niet tegelijkertijd in *E. coli* aanwezig zijn. Bovendien zijn er grote verschillen in translationele processing in een prokaryote en eukaryote cel en in de wijze waarop het virusgenoom in de bacterie wordt vermenigvuldigd. Op grond hiervan acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan.

### **4.3 Productie van HYSV eiwitten in getransfecteerde eukaryote cellen**

Voorafgaand aan de vervaardiging van HYSV replicons worden de HYSV eiwitten Gn en Gc tot expressie gebracht in eukaryote cellen. De coderende sequenties voor de overige eiwitten van het M-genoomsegment worden niet tot expressie gebracht. Door het ontbreken van deze genen en verschillende andere essentiële regulatoire sequenties van HYSV (zoals de UTR's) acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat deze werkzaamheden leiden tot het ontstaan van replicatiecompetente of infectieuze replicatiedefectieve virusdeeltjes.

### **4.4 Vervaardiging van HYSV replicon partikels in eukaryote cellen**

De aanvrager wil infectieuze zich niet verspreidende gg-HYSV deeltjes (replicons) produceren. De virusdeeltjes zullen het volledige L- en S-genoomsegment bevatten, maar het M-genoomsegment missen. Voor productie van virusdeeltjes wordt gebruik gemaakt van twee transcriptieplasmiden die coderen voor de HYSV L- en S-genoomsegmenten. De S-genoomsegmenten kunnen een fluorescent- of luciferase reportereiwit in plaats van het NSs eiwit bevatten. De eiwitten Gn en Gc die oorspronkelijk door het M segment worden gecodeerd, worden voor de productie van gg-HYSV deeltjes door middel van een stabiele of transiënte expressie van een apart expressieplasmide aangeboden. Dit expressieplasmide zal geen UTR's bevatten, waardoor het M-segment tijdens de productie niet kan repliceren en niet kan worden ingepakt in het virusdeeltje. Op deze wijze wordt een infectieus virusdeeltje geproduceerd dat zich niet kan verspreiden wegens het ontbreken van een M genoomsegment.

De aanvrager geeft aan dat het open reading frame (ORF) van het M-genoomsegment op het expressieplasmide zodanig is geconstrueerd dat er geen flankerende sequenties aanwezig zijn die homologie hebben met het L- of S-genoomsegment. Door het ontbreken van homologe sequenties is geen homologe recombinatie mogelijk. Op basis hiervan is de COGEM van mening dat de kans op replicatiecompetent HYSV door homologe recombinatie verwaarloosbaar klein is.

Bij de positief-strengige RNA virussen, zoals de alphavirussen en de pestivirussen is niet-homologe RNA recombinatie een bekend verschijnsel.<sup>16,17,18</sup> Ook voor bunyavirussen is een geval van niet-homologe RNA recombinatie gerapporteerd.<sup>19</sup> In bovenstaande situatie waarin het L- en S genoomsegment en het expressieplasmide in één cel aanwezig zijn, acht de COGEM de kans klein dat het gehele ORF van het M-genoomsegment door niet-homologe recombinatie in hetzij het L hetzij het S-genoomsegment terecht komt. De kans dat een dergelijke recombinatie op zodanige manier plaatsvindt dat een infectieus replicatiecompetent HYSV ontstaat met dezelfde fitheid als het wildtype virus, acht de COGEM zeer klein. Zoals blijkt uit een publicatie over het *Bunyamwera virus* is het moeilijk om een replicerend bunyavirus te vormen als een van de drie genoomsegmenten de UTR's bevat van een ander genoomsegment, waardoor twee verschillende genoomsegmenten dezelfde UTR's bezitten. In een enkele situatie werd autonoom replicerend *Bunyamwera virus* gecreëerd, waarbij het resulterende virus verzwakt was ten opzichte van het uitgangsvirus.<sup>20</sup>

Gebaseerd op deze gegevens acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er door homologe of niet-homologe recombinatie autonoom replicerende spreidende HYSV deeltjes kunnen ontstaan met dezelfde virulentie als het wildtype HYSV. De COGEM wijst erop dat contaminatie met een derde genoomsegment door insleep van plasmide DNA of andere menselijke fouten kan leiden tot het ontstaan van een replicatiecompetent virus. Daarom is zij van mening de uitvoerders van de experimenten alert moeten zijn op het voorkomen van deze contaminaties. Daartoe moeten zij bovendien werken met bunyavirus vrije gastheercellen. Daarnaast mogen de aanvragers maximaal twee verschillende genoomsegmenten (namelijk die voor L en S) tegelijk gebruiken.

## 5. Advies

Gezien de aard van de ziekte, de mogelijke verspreiding onder de bevolking en de afwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling is de COGEM van mening dat HYSV in pathogeniteitsklasse 4 ingedeeld moet worden.

Zowel bij de kloneringswerkzaamheden waarbij individuele genen of volledige genoomsegmenten in *E. coli* geplaatst worden als bij productie van de HYSV eiwitten Gn en Gc in eukaryote cellen kunnen niet-infectieuze HYSV deeltjes ontstaan. Daarom adviseert de COGEM om deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

In de situatie dat er bij de transfectie gebruik wordt gemaakt van de individuele L- en S-genoomsegmenten en een expressieplasmide met het coderende deel van het M-genoomsegment adviseert de COGEM transfectie en daarop volgende werkzaamheden met de gg-HYSV deeltjes in te schalen op ML-III inperkingsniveau. Zij adviseert daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Maximaal 2 volledige genoomsegmenten van HYSV zijn bij transfectie toegestaan,
- Het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van bunyavirussen,
- Open handelingen moeten uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet van klasse 3 (glovebox).

Onder bovenstaande inperkingniveau's en onder navolging van genoemde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van genoemde werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

## 6. Referenties

1. Zhao L *et al.* (2012). Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, Shandong Province, China. *Emerg Infect Dis.* June; 18(6): 963–965
2. Yu XJ *et al.* (2011). Fever with thrombocytopenia associated with a novel Bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 364 pp. 1523–1532
3. Zhang YZ *et al.* (2011). Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 32, 209–220. (in Chinese)
4. Zhang YZ *et al.* (2012). The Ecology, Genetic Diversity, and Phylogeny of Huaiyangshan Virus in China *J Virol.* March; 86(5): 2864–2868
5. Bao CJ *et al.* (2011). A family cluster of infections by a newly recognized bunyavirus in eastern China, 2007: further evidence of person-to-person transmission. *Clinical Infectious Diseases* 53, 1208–1214
6. Bao CJ *et al.* (2011). A novel bunyavirus in china. *N Engl J Med.* 365:862-5
7. Gai Z *et al.* (2012). Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact. *Clin Infect Dis.* Jan 15;54(2):249-52
8. Liu Y *et al.* (2012). Person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12, 156–160
9. Chen H *et al.* (2013). A cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus. *Int J Infect Dis.* 2013 Mar;17(3):e206-8
10. King AMQ *et al.* (editors) (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego, Elsevier Academic Press
11. VROM (2004). *Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen*
12. Health and Safety Executive (HSE). Risk assessment for safe handling of severe fever with thrombocytopenia virus. <http://www.hse.gov.uk/aboutus/meetings/committees/acdp/140212/98-P6-annex-3-sftsv-risk-assessment.pdf>
13. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/ZKBS/01\\_Allgemeine\\_Stellungnahmen\\_deutsch/09\\_Viren/SFTSV.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/09_Viren/SFTSV.pdf?__blob=publicationFile&v=2)
14. COGEM (2011). Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. COGEM advies (CGM/110321-01)
15. COGEM (2011). Advies inschaling productie genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*. COGEM advies (CGM/110322-01)
16. Hajjou M *et al.* (1996). Nonhomologous RNA-RNA recombination events at the 3' nontranslated region of the Sindbis virus genome: hot spots and utilization of nonviral sequences. *J Virol.* 70:5153-5164
17. Smerdou C and Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. *J Virol.* 73: 1092-1098
18. Gallei *et al.* (2005). Noncytopathogenic Pestivirus strains generated by nonhomologous RNA recombination: alteration in the NS4A/NS4B coding region. *J Virol.* 79:14261-14270
19. Heinze C *et al.* (2003). An unusual large intergenic region in the S-RNA of a Bulgarian tomato spotted wilt virus isolate. *Arch Virol.* 148:199-205

20. Lowen AC et al. (2005). Attenuation of Bunyavirus replication by rearrangement of viral coding and noncoding sequences. *J Virol.* 79:6940-6946