

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

**DATUM** 02 oktober 2013  
**KENMERK** CGM/131002-01  
**ONDERWERP** Advies controle van cellijnen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag van de Inspectie Leefomgeving en Transport met betrekking tot de inspectie van cellijnen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) houdt toezicht op de naleving van de wet- en regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) in Nederland. Naast de controle van gg-bacteriën en gg-schimmels op reinheid van de gebruikte stam en juistheid van het construct, is de ILT van plan om cellijnen te controleren. De inspectie heeft de COGEM gevraagd welke onderzoeken met cellijnen voor controle in aanmerking komen in verband met mogelijke milieurisico's.

Bij handelingen met cellijnen kunnen contaminaties optreden die het verloop van het onderzoek negatief kunnen beïnvloeden. Er kan contaminatie met cellen van een andere cellijn (kruiscontaminatie) of besmetting met micro-organismen optreden.

De COGEM is van mening dat cellijnen die retrovirussen of retrovirale sequenties bevatten in aanmerking komen voor controle. Dit vanuit het oogpunt dat er bij werkzaamheden met retrovirussen of retrovirale vectoren mogelijk complementatie of recombinatie kan optreden, waardoor er recombinant virus kan ontstaan. Daarnaast wijst de COGEM erop dat bij *in vitro* werkzaamheden met replicatiedeficiënte virussen, die op een lager inperkingsniveau zijn ingeschaald dan uit de classificatie van het virus volgt, er gecontroleerd dient te worden op relevante wildtype virussen of (endogene) virale sequenties waarmee het gg-virus kan recombineren.



# Controle van cellijnen

## COGEM advies CGM/131002-01

### Inleiding

De Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) houdt toezicht op de naleving van de wet- en regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) in Nederland. Dit betreft het gebruik van ggo's in laboratoria (ingeperkt gebruik), bij veldproeven en genterapie (introductie in het milieu) en bij markttoelatingen. De ILT controleert jaarlijks circa 50 instellingen en bedrijven met een vergunning voor ingeperkt gebruik. Daarnaast worden veldproeven minstens een keer per jaar bezocht en worden markttoelatingen steekproefsgewijs gecontroleerd. Deze laatste controle richt zich vooral op producten die niet tot de Europese markt zijn toegelaten, maar elders wel.<sup>1</sup>

Tijdens een controle voor ingeperkt gebruik kijkt de inspectie onder andere naar de naleving van de inrichting en werkvoorschriften. Er worden hierbij regelmatig monsters van de gebruikte genetisch gemodificeerde (gg-) micro-organismen genomen en geanalyseerd op reinheid van de gebruikte stam en juistheid van het construct. Het gaat in deze gevallen altijd om bacteriën en schimmels.

De inspectie heeft uit de wetenschappelijke literatuur opgemaakt dat cellijnen regelmatig gecontamineerd zijn. Dergelijk contaminaties zouden in sommige gevallen mogelijk tot een milieurisico kunnen leiden. De inspectie heeft de COGEM gevraagd welke onderzoeken met cellijnen voor controle in aanmerking komt in verband met mogelijke milieurisico's.

### Cellijnen

Cellijnen zijn een onmisbaar hulpmiddel voor biologisch en medisch onderzoek en worden veelvuldig gebruikt voor de productie van eiwitten, het onderzoek naar kanker, de ontwikkeling van vaccins tegen bijvoorbeeld polio, mazelen, waterpokken en de bof en bij de kweek van virussen en/of virale vectoren.

Een cellijn is een verzameling van gelijke cellen die doorgaans voortkomen uit een zogenoemde primaire celkweek. Een primaire celkweek wordt gestart met cellen die direct uit een organisme afkomstig zijn. Normaal gesproken delen cellen zich ongeveer 25 tot 40 keer waarna het vermenigvuldigingsproces stopt en de cellen doodgaan.<sup>2</sup> In sommige gevallen ontsnappen cellen aan de normale controles van de celcyclus, waardoor zij zich vrijwel oneindig kunnen vermenigvuldigen. Deze cellen kan men isoleren en opkweken voor de ontwikkeling van geïmmortaliseerde (continue) cellijnen.<sup>2</sup>

Geïmmortaliseerde cellijnen ontstaan vaak uit tumorweefsel of worden 'onsterfelijk' gemaakt met behulp van virussen, zoals het Epstein-Barr Virus, *Murine leukaemia virus*, *Rous sarcoma virus* of *Simian virus 40*. Ook kunnen cellen geïmmortaliseerd worden met plasmiden of virale vectoren die

oncogenen tot expressie brengen, zoals het SV40 large T antigen, de adenovirus E1A sequentie of de *Humaan papillomavirus* (HPV) Type 16 E6/7 sequentie.<sup>3</sup>

### **Contaminaties van cellijnen**

Handelingen met cellijnen kunnen leiden tot contaminaties die het verloop van het onderzoek negatief kunnen beïnvloeden. Bijvoorbeeld als gevolg van onachtzaamheid bij het kweken van de cellen of door het delen van media en reagentia. Er kunnen twee typen contaminaties worden onderscheiden: vermenging (of zelfs verwisseling) met cellen van een andere cellijn (kruiscontaminatie) of besmettingen met micro-organismen, zoals bacteriën, schimmels en virussen.<sup>4</sup>

#### *Kruiscontaminatie van cellijnen*

Een kruiscontaminatie tussen gekweekte cellijnen is met name bij kankeronderzoek een probleem. Onderzoek van de *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) wees uit dat 18% van 252 kanker cellijnen die bij hen ter identificatie werden aangeboden, besmet waren met cellen afkomstig van andere cellijnen.<sup>4</sup> In 2010 kwamen onderzoekers van het Erasmus Universitair Medisch Centrum tot de ontdekking dat drie van de dertien cellijnen die voor slokdarmkankeronderzoek worden gebruikt, afkomstig zijn van andere kankersoorten.<sup>5</sup> Ook andere voorbeelden zijn bekend.<sup>6,7</sup> Dergelijke vermengingen van cellijnen kunnen de uitkomsten van het onderzoek vertekenen.

#### *Besmetting met bacteriën of schimmels*

Bacteriën en schimmels (waaronder gisten) zijn vrijwel overal te vinden en kunnen een celcultuur vrij eenvoudig koloniseren vanwege de gunstige omstandigheden waarin de cellen worden gekweekt. In afwezigheid van antibiotica kunnen bacteriën meestal binnen een paar dagen na besmetting gedetecteerd worden door microscopische waarneming of door hun directe effecten op de cultuur (pH veranderingen, troebelheid van de cultuur en celdood). Ook gisten en schimmels zorgen vaak voor troebelheid van de cultuur. Dergelijke problemen worden bestreden door gebruik van antibiotica en fungiciden tijdens de celkweek.

Besmettingen met de *Mycoplasma* bacterie vormen een groot probleem. Naar schatting zijn wereldwijd 15 tot 35% van de geïmmortaliseerde cellijnen besmet met deze bacterie, waarvan 95% met *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinae*, *M. orale* of *Acholeplasma laidlawii*.<sup>8</sup> *Mycoplasma* besmettingen kunnen lang onopgemerkt blijven, omdat deze bacteriën vaak geen zichtbare besmettingsverschijnselen veroorzaken. De gevolgen voor de celkweek zijn vaak moeilijk te voorspellen, maar de organismen zijn in staat om de functie, groeisnelheid en het metabolisme van de cellen negatief te beïnvloeden.<sup>9</sup> Tevens kunnen zij chromosomale afwijkingen en cytopatische reacties veroorzaken.

### *Besmetting met virussen*

Virussen zijn vanwege hun zeer geringe afmetingen vaak moeilijk te detecteren in een celweek of te verwijderen uit kweekmedia. Maar vanwege het beperkte gastheertropisme van veel virussen (wat hun vermogen om cellen van andere gastheren te infecteren sterk beperkt) hoeft een virale besmetting niet altijd een probleem te zijn, omdat de laboratoriummedewerker er niet altijd door geïnfecteerd kan raken. Cellen kunnen echter virussen bevatten die potentieel infectieus zijn voor de medewerker. Het is daarom belangrijk om de cellen voor aanvang van de werkzaamheden te controleren op belangrijke pathogenen. De selectie van dergelijke pathogenen is afhankelijk van de herkomst van de cellen en het type virus waarmee gewerkt gaat worden. Bij humane cellen is het bijvoorbeeld belangrijk om te controleren op aanwezigheid van Hepatitis B en C, Human immunodeficiency virus (HIV), Human T-lymphotropic virus (HTLV) en *Cytomegalovirus*.

## **Overweging**

### *Milieurisico's*

#### 1: Kruiscontaminatie van cellijnen

Cellen zijn op zichzelf niet besmettelijk of pathogeen voor de mens. Ze zijn in hoge mate biologisch ingeperkt door het ontbreken van een celwand. Hierdoor kunnen de cellen slechts overleven in isotone media. Bij sterk hypotone condities gaan de cellen kapot, omdat zij de osmotische druk niet kunnen weerstaan. Tevens zijn cellen bij lagere omgevingstemperaturen en afwezigheid van voedingsstoffen, zoals essentiële aminozuren, niet in staat om te overleven of zich te verspreiden in de natuur. Dit betekent dat kruiscontaminaties voor de laboratoriummedewerker en het milieu op zichzelf geen probleem zijn.

In theorie kan er een risico ontstaan wanneer er vermenging optreedt met een cellijn die een retrovirus of retrovirale sequenties bevat (zie tabel 1 voor een lijst van dergelijke retrovirussen of retrovirale sequenties). De COGEM merkt op dat er alleen milieurisico's aan dergelijke kruiscontaminaties verbonden zijn indien er gewerkt wordt met retrovirus of retrovirale vectoren. In deze gevallen kan er complementatie of recombinatie optreden, waardoor er recombinant virus kan ontstaan. De cellijn kan ook onverhoopt humaan retrovirus bevatten, waardoor er een risico op besmetting van de laboratoriummedewerker en verspreiding in het milieu bestaat.

#### 2A: Besmetting met bacteriën of schimmels

Celculturen kunnen besmet raken met bacteriën en schimmels met als gevolg dat de celcultuur verloren kan gaan. Dergelijke contaminaties vormen geen extra milieurisico. De micro-organismen zijn vaak wildtype organismen uit de directe omgeving waar de medewerker in het dagelijks leven ook aan blootgesteld wordt en waar immuniteit tegen bestaat.

## 2B: Besmetting met virussen

Conform de Regeling worden *in vitro* werkzaamheden met replicatiecompetente virussen behorend tot pathogeniteitsklasse 2, 3 of 4, ingeschaald op het overeenkomstige inperkingsniveau ML-II, ML-III of ML-IV.<sup>10</sup> In een aantal gevallen is het mogelijk om met replicatiedeficiënte virussen *in vitro* werkzaamheden uit te voeren op een lager inperkingsniveau. Echter, door contaminatie met wildtype virussen kan via complementatie of recombinatie, replicatiecompetent virus ontstaan. Dit vereist vanuit milieurisico oogpunt een hoger inperkingsniveau. In deze gevallen acht de COGEM het noodzakelijk dat de cellijnen vrij zijn van dergelijke contaminaties of sequenties. De COGEM heeft in het verleden verschillende keren aanvullende eisen gesteld bij werkzaamheden met bepaalde klasse 3 en klasse 4 virussen die op een lager inperkingsniveau kunnen plaatsvinden. Enkele voorbeelden worden hieronder beschreven:

- *Lentivirussen*

Voor een mogelijke omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren acht de COGEM het noodzakelijk dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van HIV-1, HIV-2, *Human T-lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen. Als de toegepaste lentivirale vector bovendien een zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vector is en geproduceerd met een productiesysteem van de tweede of derde generatie adviseert de COGEM de vectorproductie omlaag te schalen naar ML-II inperkingsniveau.<sup>11</sup>

- *Rift Valley fever virus*

De COGEM heeft RVFV in 2008 geclassificeerd als een klasse 3 pathogeen.<sup>12</sup> In 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met replicatie incompetent gg-RVFV.<sup>13</sup> De COGEM adviseerde om de productie van gg-RVFV virusdeeltjes uit te voeren op ML-II inperkingsniveau onder navolging van de volgende aanvullende voorschriften:

- Het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van RVFV en andere verwante bunyavirussen,
- Het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van UTR sequenties van het M-genoomsegment van RVFV en andere bunyavirussen,
- Gedurende de periode dat deze experimenten worden uitgevoerd zijn op het ML-II lab geen plasmiden aanwezig met het volledige M-genoomsegment of met de UTR sequenties van het M-genoomsegment.

- *Crimean Congo hemorrhagic fever virus*

De COGEM heeft CCHFV in 2011 geclassificeerd als klasse 4 pathogeen.<sup>14</sup> Werkzaamheden met infectieuze niet-spreidende CCHFV deeltjes waarin geen zogenaamde minigenomen aanwezig zijn, adviseert de COGEM op ML-III inperkingsniveau in te schalen onder toevoeging van de volgende aanvullende voorschriften.

- Maximaal 2 volledige genoomsegmenten van CCHFV zijn bij transfectie toegestaan,
  - Het minigenoom mag hetzij de wildtype UTR's van het S-genoomsegment hetzij de wildtype UTR's van het L-genoomsegment van CCHFV bevatten,
  - Het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van bunyavirussen,
  - Open handelingen moeten uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet van klasse 3 (glovebox).
- *Huaiyangshan virus*  
De COGEM is van mening dat HYSV in pathogeniteitsklasse 4 ingedeeld moet worden. Werkzaamheden met infectieuze zich niet-verspreidende HYSV deeltjes adviseert de COGEM op ML-III inperkingsniveau in te schalen onder toevoeging van de volgende aanvullende voorschriften:
    - 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).

#### Advies

De COGEM is van mening dat cellijnen die retrovirussen of retrovirale sequenties bevatten in aanmerking komen voor controle. Dit vanuit het oogpunt dat er bij werkzaamheden met retrovirussen of retrovirale vectoren er mogelijk complementatie of recombinatie kan optreden in gecontamineerde cellijnen, waardoor er recombinant virus kan ontstaan.

Bij *in vitro* werkzaamheden met replicatiedeficiënte virussen, die op een lager inperkingsniveau zijn ingeschaald dan uit de classificatie van het virus volgt, dient er gecontroleerd te worden op relevante wildtype virussen of (endogene) virale sequenties waarmee het gg-virus kan recombineren.

Tabel 1. Retrovirus of retrovirale sequenties waarvan bekend is dat zij in cellijnen voorkomen <sup>15</sup>	
Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1)	Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)
Human T-lymphotropic virus 2 (HTLV-2)	Squirrel monkey retrovirus (SMRV)
Murine leukemia virus (MLV)	Retroviral vector
Moloney murine leukemia virus (MoMLV)	Ecotropic retroviral Vector
Abelson murine leukemia virus (AbMLV)	Murine ecotropic retrovirus
Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV)	Feline leukemia virus (FeLV)
Human immunodeficiency virus (HIV)	Bovine leukemia virus (BLV)
Rous sarcoma virus (RSV)	Gibbon ape leukemia virus (GaLV)
Harvey murine sarcoma virus (HSV)	Mouse mammary tumor virus (MMTV)
J2-Retrovirus	

## Referenties

1. Inspectie Leefomgeving en Transport: [www.ilent.nl/onderwerpen/leefomgeving/milieu/genetisch-gemodificeerde-organismen/](http://www.ilent.nl/onderwerpen/leefomgeving/milieu/genetisch-gemodificeerde-organismen/)
2. Bruce Alberts *et al.* (2002). Molecular biology of the cell. 4th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
3. Stacey G & MacDonald C (2001). Immortalisation of primary cells. *Cell Biol Toxicol.* 17: 231- 46.
4. Capes-Davis A *et al.* (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 127(1): 1-8
5. Boonstra JJ *et al.* (2010). Verification and Unmasking of Widely Used Human Esophageal Adenocarcinoma Cell Lines. *J Natl Cancer Inst.* 102(4): 271-274
6. Retraction Watch. Cancer cell line mixup leads to retraction. <http://bit.ly/16T070j> (26-09-13)
7. Retraction Watch. Cell line mixup causes retraction of paper on blood vessel damage. <http://bit.ly/14Xtul1> (26-09-13)
8. Uphoff CC. Cell Culture Mycoplasmas. DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.
9. Landon SP. (2004). Cancer Cell Culture: Methods and protocols. Humana Press Inc.
10. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
11. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM Advies CGM/090331-03
12. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met het genetisch gemodificeerd Rift Valley fever virus (RVFV). COGEM advies CGM/080313-05
13. COGEM (2011). Inschaling werkzaamheden genetische gemodificeerd Rift Valley fever virus (RVFV). COGEM advies CGM/110322-01
14. COGEM (2011). Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met Crimean-Congo hemorrhagic fever virus COGEM advies CGM/110321-01
15. Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe 468. Liste der Zelllinien und Tätigkeiten mit Zellkulturen