

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 18 maart 2015  
**KENMERK** CGM/150318-01  
**ONDERWERP** Advies classificatie en inschaling van werkzaamheden met gg-*Cowpox virus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Immuunmodulatie door virussen', afkomstig van Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van *Cowpox virus* (CPXV). De aanvrager wil door middel van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)CPXV onderzoeken welke gastheercelfactoren betrokken zijn bij een virusinfectie met CPXV. De COGEM is verder verzocht te adviseren over de inschaling van deze werkzaamheden.

Het CPXV is een diervirus en heeft knaagdieren als natuurlijke gastheer. Het virus is enzoötisch in Nederland. In knaagdieren veroorzaakt het virus een mild ziektebeeld. CPXV kan ook andere zoogdieren infecteren, waaronder katten, ratten, koeien en de mens. Het virus kan onder andere overgedragen worden van katten en ratten op de mens. De ziekteverschijnselen bij mensen zijn mild en de overdracht van mens-op-mens is niet beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Gezien de milde ziekteverschijnselen en de aanwezigheid van CPXV in Nederland adviseert de COGEM om CPXV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De aanvrager wil een gg-CPXV vector met daarin twee markergenen transfacteren in dierlijke cellen.

Op grond van de inschaling van het *Cowpox virus* in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM de voorgestelde werkzaamheden met gg-CPXV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder het genoemde inperkingsniveau en onder navolging van enkele aanvullende voorschriften verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Classificatie en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Cowpox virus*

## COGEM advies CGM/150318-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Cowpox virus* (CPXV) en de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)CPXV. De aanvrager wil de laboratoriumwerkzaamheden uitvoeren met een gg-CPXV die gebaseerd is op de CPXV stam 'Brighton Red' en de genen bevat die coderen voor het 'enhanced green fluorescent protein' (eGFP) en het 'monomeric red fluorescent protein' (mRFP). De aanvrager wil onder andere onderzoeken welke gastheercelfactoren betrokken zijn bij een virusinfectie met CPXV.

### *Cowpox virus*

Het *Cowpox virus* (CPXV, koepokkenvirus) behoort tot het genus *Orthopoxvirus* en de familie *Poxviridae*. Hiertoe behoren ook het *Vaccinia virus*, *Monkeypox virus* en *Variola virus*.<sup>1</sup> CPXV heeft een lineair dubbelstrengs DNA met een lengte van ongeveer 223 kb en de replicatie van het virus vindt plaats in het cytoplasma van een geïnfecteerde cel.

De natuurlijke gastheer van CPXV zijn knaagdieren waarin het virus milde ziekteverschijnselen veroorzaakt.<sup>2</sup> Het virus komt voor bij verschillende soorten knaagdieren in West-Europa, waaronder de rosse woelmuis (*Clethrionomys glareolus*), de bosmuis (*Apodemus sylvaticus*), de aardmuis (*Microtus agrestis*) en de huismuis (*Mus musculus*).<sup>3</sup> Knaagdieren kunnen experimenteel via de huid en de orale- of respiratoire route geïnfecteerd worden. Hoe het virus zich in de natuurlijke omgeving verspreid, is echter onbekend. Overdracht van CPXV vindt niet plaats onder in laboratorium gehuisveste knaagdieren.<sup>4</sup> Het virus is enzoötisch in Nederland.<sup>5</sup>

Behalve knaagdieren kunnen ook katten, honden, koeien, paarden, primaten, verschillende soorten diertuindieren, en mensen geïnfecteerd worden met CPXV.<sup>6</sup> In 1985 is de overdracht van CPXV van een kat op een mens in de wetenschappelijke literatuur beschreven.<sup>7</sup> Besmetting van mensen met CPXV vindt plaats via beschadigingen van de huid door krabben of bijten van een besmet dier. Sindsdien zijn er meerdere zoönotische infecties met CPXV in Europa beschreven.<sup>8</sup> De meeste humane infecties met CPXV worden veroorzaakt door besmetting via besmette katten of ratten die als huisdier gehouden worden. In 2009 zijn er in Duitsland en Frankrijk uitbraken geweest van CPXV bij mensen die ratten als huisdier hielden. De uitbraak werd veroorzaakt doordat er CPXV besmette ratten verkocht waren.<sup>9,10</sup>

Bij de mens veroorzaakt CPXV lokale laesies van de huid. De meest voorkomende ziekteverschijnselen zijn misselijkheid, spierpijn, koorts en opgezette lymfeklieren.<sup>4,11</sup> Meestal is er één laesie en duurt het gemiddeld 6 tot 8 weken voordat deze genezen is. Bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem of een huidziekte verloopt de infectie met CPXV ernstiger en kan de patiënt overlijden.<sup>12,13</sup> Overdracht van mens-op-mens is niet beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Er is geen vaccin beschikbaar, maar mogelijk geeft een vaccinatie tegen pokken kruisbescherming tegen een infectie met CPXV.<sup>14</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager beschikt over een 'bacterial artificial chromosome' (BAC) clone waarin het genetisch materiaal van Cowpox virus stam 'Brighton Red' en de twee marker genen aanwezig zijn. De marker genen zijn geïntroduceerd in het gen van CPXV dat codeert voor het thymidine kinase. Het gen dat codeert voor het 'enhanced green fluorescent protein' (eGFP) staat onder controle van de 'late' promotor p4B van *Fowlpox virus* (FWPV) en het 'monomeric red fluorescent protein' (mRFP) staat onder controle van een synthetisch 'early' *Vaccinia virus* promotor Psyn7.5.<sup>15,16</sup>

De aanvrager wil de BAC clone transfecteren in dierlijke cellen die al dan niet genetisch gemodificeerd zijn. De gg-cellen zijn afkomstig van ML-I inperkingsniveau. De aanvrager is voornemens om de transfectie en de analyse van de getransfecteerde cellen uit te voeren op ML-II inperkingsniveau met in achtneming van de volgende aanvullende voorschriften: medewerkers die eczeem hebben, zwanger zijn of HIV positief zijn, worden uitgesloten van de werkzaamheden. Daarnaast worden open handelingen met het gg-virus uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse 2 en worden handschoenen tot over de mouw gedragen.

### **Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)**

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) 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;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

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

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

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

CPXV is door het Duitse ‘The Federal Institute for Occupational Safety and Health’<sup>17</sup>, het Belgische ‘Scientific Institute of Public Health’<sup>18</sup> en het Engelse ‘Health and Safety Executive’<sup>19</sup> ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-CPXV. Wel heeft zij het *Vaccinia virus* uit hetzelfde genus *Orthopoxvirus* en het *Fowlpox virus* uit het genus *Avipoxvirus* geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.<sup>20,21,22,23</sup> In 2014 heeft de COGEM een signalering uitgebracht waarin zij de elementen uiteenzet die van belang zijn bij de classificatie van dierpathogene virussen.<sup>24</sup>

### **Overweging en advies**

#### *Classificatie van CPXV*

CPXV heeft knaagdieren als de natuurlijke gastheer en een infectie verloopt mild. Hoe de verspreiding van het virus plaatsvindt, is niet bekend. Het virus is enzoïtisch in Nederland en kan andere gastheren infecteren, zoals koe, kat, hond, paard en rat. De mens kan direct door knaagdieren geïnfecteerd worden, maar ook door bijvoorbeeld geïnfecteerde katten en ratten. Infectie van de mens vindt plaats via beschadiging van de huid door het krabben of bijten van een besmet dier. Het virus veroorzaakt een zelflimiterende infectie bij de mens en de ziekteverschijnselen zijn mild. Een CPXV infectie kan in personen met een verzwakt immuunsysteem ernstige ziekteverschijnselen veroorzaken. In de wetenschappelijke literatuur is geen overdracht van CPXV van mens-op-mens beschreven. Er is geen behandeling of vaccin beschikbaar, maar mogelijk geeft een vaccinatie tegen pokken kruisbescherming tegen een CPXV infectie.<sup>14</sup>

Op basis van de bovenstaande argumenten adviseert de COGEM het *Cowpox virus* in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

#### *gg-CPXV*

In het gg-CPXV dat de aanvrager in dierlijke cellen wil transfacteren, zijn de genen voor eGFP en mRFP geïntroduceerd in het gen dat codeert voor thymidine kinase. De expressie van eGFP staat onder controle van de ‘late’ promotor van FWPV. Hoewel het FWPV een virus uit een ander genus is dan CPXV, zou er in theorie homologe recombinatie kunnen plaatsvinden binnen het promotergebied wanneer FWPV in de cel aanwezig is. Omdat er tijdens de voorgenomen werkzaamheden niet gelijktijdig met FWPV gewerkt wordt, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er

homologe recombinatie plaatsvindt en er door deze recombinatie een virus ontstaat met een hogere pathogeniteit dan de uitgangsvirussen.

Het eGFP en mRFP zijn markereiwitten die al lange tijd zonder incidenten in biomedisch wetenschappelijk onderzoek gebruikt worden. De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat het gg-CPXV door de aanwezigheid van eGFP en mRFP een verhoogde pathogeniteit zal hebben ten opzichte van het wild-type virus.

De aanvrager wil naast dierlijke cellen ook genetisch gemodificeerde dierlijke cellen transfecteren. Deze gg-cellen bevatten mogelijk virale sequenties van herpesvirussen. Omdat de replicatie van het gg-CPXV plaatsvindt in het cytoplasma, herpesvirussen in de celkern repliceren en er weinig sequentieovereenkomst is, acht de COGEM de kans op recombinatie verwaarloosbaar klein.

Op basis van de inschaling van het *Cowpox virus* in pathogeniteitsklasse 2 en de aard van de markereiwitten eGFP en mRFP adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden conform artikel 5.4.3.i van Bijlage 5 uit de Regeling ggo op ML-II-k inperkingsniveau in te schalen en daarbij de volgende aanvullende maatregelen te hanteren:

- De volgende medewerkers zijn uitgesloten van de bovengenoemde werkzaamheden:
  - medewerkers die lijden aan eczeem,
  - medewerkers die zwanger zijn,
  - medewerkers waarvan het immuunsysteem niet goed functioneert, en
  - medewerkers die seropositief zijn voor HIV.
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden.
- Het dragen van handschoenen over de mouw van de werkkleding tijdens de werkzaamheden is verplicht.

Onder genoemd inperkingsniveau en onder navolging van deze aanvullende voorwaarden is de COGEM van mening dat de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-CPXV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Skinner MA *et al.* (2012). The Double Stranded DNA Viruses, Family *Poxviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Inc., Amsterdam
2. Feore SM *et al.* (1997). The effect of cowpox virus infection on fecundity in bank voles and wood mice. *Proc Biol Sci* 264: 1457-1461
3. Vorou RM *et al.* (2008). Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis* 21: 153-156
4. Bennett M *et al.* (2008). Cowpox Virus. In *Encyclopedia of Virology*, Third edition. Ed. Mahy BWJ *et al.*, Academic Press, San Diego

5. RIVM. Wilde knaagdieren en zoönosen. Cowpox (koepokken). [www.rivm.nl/Onderwerpen/W/Wilde\\_knaagdieren\\_en\\_zo%C3%B6nosen/Ziekteverwekkers/Cowpox\\_koepokken](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/W/Wilde_knaagdieren_en_zo%C3%B6nosen/Ziekteverwekkers/Cowpox_koepokken) (bezocht: 16 maart 2015)
6. Haller SL *et al.* (2014). Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol* 21: 15-40
7. Willemse A & Egberink HF (1985). Transmission of cowpox virus infection from domestic cat to man. *Lancet* 1: 1515
8. Essbauer S & Meyer H (2007). Genus *Orthopoxvirus: Cowpox virus*. In *Poxviruses*. Ed. Mercer AA *et al.*, Birkhäuser Verlag, Basel
9. Campe H *et al.* (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis* 15: 777-780
10. Ninove L *et al.* (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis* 15: 781-784
11. Becker C *et al.* (2009). Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch Arztebl Int* 106: 329-334
12. Haase O *et al.* (2011). Generalized cowpox infection in a patient with Darier disease. *Br J Dermatol* 164: 1116-1118
13. Eis-Hübinger AM *et al.* (1990). Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet* 336: 880
14. Nederlandse Voedsel- en Waren Autoriteit (2009). Staat van zoönosen 2009. [www.vwa.nl/txmpub/files/?p\\_file\\_id=2200194](http://www.vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=2200194). (bezocht: 9 maart 2015)
15. Roth SJ *et al.* (2011). Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). *Vet Res* 42: 3
16. Xu Z *et al.* (2014). Generation of a complete single-gene knockout bacterial artificial chromosome library of cowpox virus and identification of its essential genes. *J Virol* 88: 490-502
17. The Federal Institute for Occupational Safety and Health (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen. [www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?\\_blob=publicationFile&v=4](http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?_blob=publicationFile&v=4) (bezocht: 9 maart 2015)
18. Scientific Institute of Public Health (2009). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. [www.biosafety.be/PDF/2009\\_classification\\_lists/H\\_A\\_virus.pdf](http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf) (bezocht: 9 maart 2015)
19. Health and Safety Executive (2013). The Approved List of biological agents. [www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf](http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf) (bezocht: 9 maart 2015)
20. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen en aanvullende voorschriften. COGEM advies CGM/030519-06
21. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen. COGEM advies CGM/030922-04
22. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (CGM/141218-02). COGEM advies CGM/141218-02
23. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene DNA virussen. COGEM advies CGM/130917-01

24. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM  
signalering CGM/141013-02