

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Datum 15 januari 2007
Kenmerk CGM/070115-01
Onderwerp Advies inschaling van handelingen met humane parechovirussen (IG 06-114)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van werkzaamheden met parechovirussen door het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde humane parechovirussen types 1-5 (HPeV1-5). Om de functie van de verschillende genen van deze virussen te onderzoeken wil de aanvrager puntmutaties en deleties aanbrengen. Tevens wil hij genen en niet-coderende sequenties van deze verschillende types onderling én met enterovirussen combineren. Gecombineerde virussen worden chimere virussen genoemd.

HPeV1 en -2 zijn in het verleden reeds geclassificeerd als organismen behorend tot pathogeniteitsklasse 2. Gezien de verwantschap van HPeV3-5 met deze virussen en het laagpathogene karakter van de bekende parechovirussen, is de COGEM van mening dat alle parechovirustypes in klasse 2 geclassificeerd kunnen worden.

De COGEM adviseert om werkzaamheden waarbij geen chimere virussen gebruikt worden in te schalen op ML-II niveau. De COGEM acht het aannemelijk dat het muteren van parechovirussen zal leiden tot een virus dat (sterk) verzwakt is.

Verder adviseert zij om werkzaamheden met chimere virussen uit te voeren onder inperkingsniveau ML-III om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen. Zij acht deze inschaling noodzakelijk aangezien in de literatuur nog slechts zeer weinig beschreven is over de eigenschappen van sommige parechovirussen. Mogelijkerwijs zou een virus kunnen ontstaan dat pathogener is dan het uitgangsvirus.

Om eventuele risico's bij de werkzaamheden verder te minimaliseren, adviseert de COGEM het hanteren van aanvullende voorschriften. Dit betekent dat het dragen van handschoenen noodzakelijk is en dat open handelingen dienen te worden uitgevoerd in een veiligheidsklasse-II kabinet.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Inschaling van handelingen met humane Parechovirussen

COGEM advies CGM/070115-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO betreffende de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) humane parechovirussen. De aanvrager is onder andere voornemens om chimere virussen te vervaardigen door het combineren van parechovirussen onderling en door het combineren van parechovirussen met enterovirussen. Met behulp van deze experimenten wil hij de functies van de genen van parechovirussen onderzoeken.

Om meer inzicht te geven in de wijze waarop de COGEM tot haar inschaling komt, zal in eerste instantie worden ingegaan op enkele kenmerken van humane parechovirussen. Hierna worden de handelingen met de genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) beschreven. Ten slotte komt de risicobeoordeling aan bod.

Humane parechovirussen

Humane parechovirussen vormen een apart genus binnen de familie der *Picornaviridae*. Picornavirussen zijn positieve enkelstrengs RNA virussen zonder envelop. De sequentiehomologie tussen de verschillende picornavirussen is minder dan 40%. Naast parechovirussen vallen acht andere virusgenera binnen de familie der *Picornaviridae* zoals enterovirussen, hepatovirussen en aphthovirussen (1).

Humaan Parechovirus 1 en 2 (HPeV1, HPeV2) werden lange tijd beschouwd als enterovirussen en werden echo22 en -23 genoemd. Met behulp van moleculaire technieken werd duidelijk dat echo22 en -23 genetisch duidelijk afwijkend waren van alle andere picornavirussen (2). Echo22 en -23 zijn daarom hernoemd tot HPeV1 en -2 en ingedeeld in een apart genus. Recentelijk zijn 3 nieuwe varianten beschreven, zijnde HPeV3-5 (4;6;8).

Het genoom van picornavirussen is 7000 tot 9500 basen groot en wordt in een enkel polypeptide afgelezen. Dit polypeptide wordt vervolgens door proteolytische klieving in de functionele eiwitten omgezet. Vier van de structurele genen, VP1 t/m 4, zijn verantwoordelijk voor de opbouw van de mantel van het virus. In tegenstelling tot de andere picornavirussen, wordt bij parechovirussen het precursor eiwit VP0 niet gekliefd in VP2 en V4, waardoor de mantel niet uit vier maar uit drie eiwitten is samengesteld, VP0, VP1 en VP3 (3). De C-terminus van VP1 bevat een zogenaamd RGD-motief, waarvan bekend is dat het betrokken is bij de aanhechting aan de cel. Hierdoor beïnvloed

het RGD-motief ook het tropisme van het virus. HPeV3 wijkt structureel af van de andere parechovirussen door het ontbreken van dit RGD-motief (4).

De aanvrager geeft aan dat parechovirussen, net als enterovirussen, worden overgedragen via de fecaal-orale route. Andere transmissieroutes van enterovirussen verlopen mogelijk via oraal-oraal contact (5). Symptomen veroorzaakt door parechovirussen komen sterk overeen met de symptomen die optreden bij een infectie met enterovirussen (6). Infecties met HPeV vinden voornamelijk plaats in kinderen jonger dan drie jaar (7).

HPeV1 wordt gezien als een wijdverspreid pathogeen. Meer dan 95% van de volwassen bevolking heeft antistoffen tegen HPeV1 (2). Dit virus leidt voornamelijk bij jonge kinderen tot ziekte. HPeV1 infecties geven gewoonlijk milde gastrointestinale symptomen of symptomen in de luchtwegen (7). Er zijn echter ook rapportages van ernstigere ziekteverschijnselen, zoals encefalitis (hersenontsteking) en spierverlammingen (7).

De zeer recentelijk geïdentificeerde HPeV3 variant geeft ernstigere ziekteverschijnselen dan de andere HPeV varianten, zoals tijdelijke verlammingen en sepsis (7). Uit een studie kwam naar voren dat 85% van de Japanse kinderen in de leeftijdsgroep van vier tot zes jaar antistoffen tegen HPeV3 bezit. Ook van de volwassenen ouder dan 40 jaar bezit 87% antistoffen tegen dit serotype (4).

Een infectie met HPeV2 leidt met name tot gastrointestinale symptomen, maar lijkt zeldzaam (7). Over een periode van 40 jaar is HPeV2 in Zweden namelijk in slechts vijf patiënten waargenomen (3).

Het vierde en het vijfde parechovirustype zijn pas recentelijk beschreven (6;8). De COGEM wijst er hierbij op dat de taxonomische classificatie nog niet officieel is vastgesteld. Verschillende laboratoria hanteren hierdoor een andere indeling voor deze nieuwe virussen, waardoor verwarring kan ontstaan over de correcte benaming. Overigens zijn alle virustypes gesequenced.

Eerder COGEM advies

In 2002 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met picornavirussen, waarbij mutaties werden aangebracht in de voor verschillende eiwitten coderende gebieden (CGM/020823-06) (9). Hiernaast werden chimere virussen gemaakt. Naar de mening van de COGEM had de aanvrager de samenstelling van de recombinante virussen onvoldoende gespecificeerd. Hierdoor was het voor de COGEM niet mogelijk de fitness van de uiteindelijk gegenereerde recombinante virussen goed te voorspellen. De COGEM heeft daarom destijds geadviseerd de werkzaamheden in te schalen op ML-III niveau (9).

Later dat jaar is een tweede advies afgegeven met betrekking tot polio- en non-polio enterovirussen (CGM/021017-01) (10). Daarin wordt gesteld dat wildtype poliovirus tot

pathogeniteitsklasse 2 behoort, zolang het virus nog niet wereldwijd is uitgeroeid en vaccinaties nog niet zijn stopgezet. De COGEM was van mening dat de geconstrueerde chimere en gemuteerde poliovirussen niet tot een hogere pathogeniteit of virulentie zullen leiden ten opzichte van wildtype poliovirus. Destijds is daarom geadviseerd de werkzaamheden in te schalen op ML-II niveau met als aanvullende voorschriften dat laboratoriummedewerkers gevaccineerd dienden te worden tegen polio. Hiervoor werden de volgende vier argumenten aangevoerd: 1) de gehele sequentie van het poliovirus was bekend, 2) vrijwel de gehele wereldpopulatie is ingeënt tegen polio in kader van het polio-eradicatieprogramma, 3) polio wordt primair verspreid via de oraal-fecale route en 4) humane enterovirussen zijn sterk verspreid in de humane populatie. Hierdoor lijkt het onwaarschijnlijk dat er door constructie van chimeren een combinatie van genen gemaakt wordt die niet al een keer in de natuur is ontstaan (10).

De adviesvraag

Het doel van het onderzoek is om de functies van de verschillende genen van humane parechovirussen te bepalen. Hiertoe worden puntmutaties en deleties aangebracht in de structurele, in de niet-structurele genen en in de zogenaamde '5'-non-translated region' van parechovirussen. Verder zullen chimere virussen gemaakt worden bestaande uit de niet-structurele genen van een bepaald type parechovirus in combinatie met de structurele genen of de 'non-translated region' afkomstig van een ander type parechovirus of van een enterovirus (waaronder Coxsackievirussen en Echovirussen). Daarnaast zullen ook in deze chimere virussen gerichte puntmutaties of deleties aangebracht worden. Dergelijke mutaties worden onder andere aangebracht in het RGD-motief.

De vervaardigde gg-virussen worden vervolgens gebruikt om een groot aantal verschillende eukaryotische cellijnen en primaire cellen te infecteren. Het betreft hier onder andere humane- en hamstercellen. De eigenschappen van de virussen worden daarna getest met behulp van verscheidene technieken.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over het inschalingsvoorstel van Bureau GGO. Om een uitspraak te kunnen doen over het voorstel, zal in eerste instantie de pathogeniteit van de virussen en de virulentie van het ggo beoordeeld worden, waarna de inschaling van de werkzaamheden volgt.

Pathogeniteitsklasse

Virussen worden aan de hand van hun virulentie en hun verspreidingsvermogen onder de bevolking ingedeeld in pathogeniteitsklassen. In het verleden heeft de COGEM picornavirussen geclassificeerd als klasse 2 pathogenen, met uitzondering van het *Mond-*

en *Klauwzeervirus* (genus *Aphthovirus*) en het *Swine vesicular disease virus* (genus *Enterovirus*) (11). Een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 kan bij mensen (en dieren) een ziekte veroorzaken waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat (12).

Ten tijde van de classificatie door de COGEM waren slechts HPeV1 en -2 bekend. Inmiddels zijn HPeV3-5 ontdekt, welke nog niet geclassificeerd zijn. De overeenkomst in aminozuurvolgorde tussen HpeV1 en -2 in vergelijking met HpeV3 en -4 bedraagt ongeveer 85% (4;8). Dit wijst op een sterke verwantschap tussen de verschillende virussen.

Een infectie met HPeV3 kan in sommige gevallen leiden tot ernstigere symptomen dan bij een infectie met HPeV1 of -2. Het blijkt dat HPeV3 ten opzichte van HPeV1 en -2 met name zeer jonge kinderen infecteert. In de literatuur wordt daarom gesuggereerd dat een mogelijke verklaring voor het optreden van ernstige symptomen de jonge leeftijd is waarop infecties met HPeV3 plaatsvinden (7). Verder veroorzaken parechovirussen in veel gevallen asymptomatische of milde infecties (6). HPeV1 en -3 zijn wijd verspreid onder de bevolking. Zoals eerder is aangegeven, heeft 95% van de volwassenen bevolking antistoffen tegen HPeV1 en 87% van de volwassenen antistoffen tegen HPeV3 (2;4).

Gezien de verwantschap en het laagpathogene karakter van HPeV1 en -2, is de COGEM van mening dat de types HPeV3-5 ook ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2.

Het ggo

De aanvrager is voornemens om genetische gemodificeerde virussen te vervaardigen door het combineren van genen en niet-coderende sequenties van humane parechovirussen. Daarnaast wil hij parechovirussen combineren met enterovirussen. Om de risico's voor mens en milieu van deze werkzaamheden te kunnen inschatten, beoordeelt de COGEM de kans dat het combineren van de verschillende sequenties leidt tot een virus dat pathogener is dan het uitgangsvirus.

Mutagenese ten gevolge van puntmutaties treedt in de natuur veelvuldig op bij RNA virussen. Mutaties hebben soms geleid tot virussen met een verhoogde fitness, maar leiden meestal tot een verminderde fitness. Het kunstmatig aanbrenge van mutaties zal daarom hoogstwaarschijnlijk ook niet leiden tot virussen met een verhoogde virulentie of fitness ten opzichte van virussen die in de natuur reeds zijn ontstaan. Verder leiden deleties in het genoom van virussen in het algemeen ook tot verzwakte virussen. De COGEM is daarom van mening dat het vervaardigen van punt- en deletiemutanten in de

onderhavige werkzaamheden hoogstwaarschijnlijk zal leiden tot virussen met een sterk verminderde fitness. De COGEM acht de kans op het ontstaan van virussen die pathogener zijn dan het uitgangsvirus daarom klein.

In tegenstelling tot het vervaardigen van punt- en deletiemutanten van parechovirussen is de COGEM van mening dat meer voorzichtigheid betracht moet worden bij het hanteren van chimere virussen. Uit de literatuur blijkt dat recombinatie tussen enterovirussen in de natuur veelvuldig voorkomt en dat dit een belangrijke wijze is waardoor de virulentie toeneemt en de transmissieroute verandert (13;14).

De COGEM acht het aannemelijk dat wanneer de uitgangsvirussen fecaal-oraal overdraagbaar zijn, het chimere virus dit ook zal zijn. Echter, het werkelijke (cel-) tropisme is niet van alle virussen bekend. De COGEM is daarom van mening dat niet geheel uit te sluiten is dat een virus zal ontstaan met een veranderde transmissieroute. Mogelijkerwijs zou bijvoorbeeld het tropisme van HPeV3 kunnen veranderen na toevoeging van een sequentie coderend voor het VP1 eiwit, waarop zich in HPeV1 het RGD-motief bevindt dat normaliter ontbreekt in HPeV3.

Verder is de COGEM van mening dat de vervaardigde chimere virussen in veel gevallen verminderd virulent zullen zijn of geen verhoogde virulentie zullen vertonen ten opzicht van virussen in de natuur. Echter, de COGEM sluit het ontstaan van een gg-virus dat virulenter is dan het uitgangsvirus niet geheel uit. Met name omdat over de virussen HPeV3-5 op dit moment (zeer) weinig bekend is.

Inperkingsniveau en aanvullende voorschriften

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat werkzaamheden waarbij geen chimere virussen gebruikt worden, kunnen worden uitgevoerd onder niveau ML-II. De COGEM acht namelijk de kans groot dat het aanbrengen van mutaties in parechovirussen zal leiden tot verzwakte virussen.

Normaliter worden werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen van pathogeniteitsklasse 2 uitgevoerd op inperkingsniveau ML-II. Echter, zoals reeds gesteld is, bestaat er bij de onderhavige werkzaamheden een kans op het ontstaan van chimere virussen die pathogener zijn dan de uitgangsvirussen. Verder ontbreekt informatie in de literatuur over HPeV4 en -5. Dit maakt dat de COGEM in dit geval adviseert om werkzaamheden met de vervaardigde chimere virussen uit te voeren onder inperkingsniveau ML-III. Indien de aanvrager meer gegevens kan overleggen over HPeV3-5 is een casus-gerichte omlaagschaling naar ML-II niveau mogelijk.

De COGEM acht het hanteren van aanvullende voorschriften onder beide inperkingsniveaus noodzakelijk. Dit betekent dat open handelingen uitgevoerd dienen te

worden in een klasse II veiligheidskabinet. Daarnaast dienen laboratoriummedewerkers handschoenen te dragen om zo de kans op infecties te minimaliseren.

Voor de transfectie zal in de onderhavige werkzaamheden naast cellijnen ook gebruik gemaakt worden van primaire cellen. Deze cellen worden onder meer getest op HIV-1, HBV en HCV. De cellen worden echter niet getest op de eventuele aanwezigheid van picornavirussen. In geval van een dergelijke besmetting, zou na transfectie van de cellen mogelijk recombinitie tussen deze virussen en de gg-virussen kunnen optreden. Dit recombinante virus zou eventueel een risico kunnen vormen voor de medewerker wanneer contact optreedt.

Echter, de kans dat de primaire cellen daadwerkelijk besmet zijn met picornavirussen is volgens de COGEM bijzonder klein. Picornavirussen hebben in de regel celdood tot gevolg, waardoor een infectie snel merkbaar is. De COGEM acht het daarom niet noodzakelijk om de primaire cellen te testen op aanwezigheid van picornavirussen.

Conclusie

Concluderend adviseert de COGEM dat alle tot nu toe bekende parechovirussen ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2. Zij merkt hierbij op dat deze indeling betrekking heeft op werkzaamheden die tot de genetische modificatie van parechovirussen leiden.

Verder adviseert de COGEM om werkzaamheden waarbij geen gebruik gemaakt wordt van chimere virussen in te schalen op ML-II inperkingsniveau. Werkzaamheden met chimere virussen dienen daarentegen uitgevoerd te worden op inperkingsniveau ML-III. De COGEM acht het noodzakelijk om handschoenen te dragen en om open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse-II.

Referenties

1. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Cartens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (2002). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic press, San Diego. USA
2. Stanway G. and Hyypiä T. (1999). Parechoviruses. J. Virol. 73: 5249-5254
3. Stanway G., Joki-Korpela P. and Hyypiä T. (2000). Human parechoviruses-biology and clinical significance. Rev. Med. Virol. 10: 57-69
4. Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H., Takeda N. and Sakae K. (2004). Isolation and identification of a novel human parechovirus. J. Gen. Virol. 85: 391-398

5. Verboon-Maciolek, M.A., Nijhuis, M., Van Loon, A.M. *et al.* (2003). Diagnosis of Enterovirus infection in the first 2 months of life by real-time polymerase chain reaction. *CID* 37: 1-6
6. Al-Sunaidi, M., Williams, C.H., Hughes, P.J. *et al.* (2007). Analysis of a new human parechovirus allows the detection of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J. Virol.* 81(2): 1013-1021
7. Benschop, K.S.M., Schinkel, J., Minnaar, R.P. *et al.* (2006). Human Parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *CID* 42: 204-210
8. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling 1998
9. Benschop, K.S.M., Schinkel, J., Luken, M.E. *et al.* (2006). Fourth human parechovirus serotype. *Emerg. Infect. Dis.* 12(10): 1572-1575
10. COGEM (2002) Molecular and cellular aspects of picornavirus replication (CMG/020823-06)
11. COGEM (2002) Reverse genetics van polio- en non-polio enterovirus (CGM/021017-01)
12. COGEM (1998) Regeling genetisch gemodificeerde organismen en richtlijnen van de COGEM bij deze regeling
13. Oberste, M.S., Maher, K. En Pallansch, M.A. (2004). Evidence for frequent recombination within species *Human Enterovirus B* based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* 78(2): 855-867
14. Simmonds, P. (2006). Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses. *J. Virol.* 80(22): 11124-11140