

Aan de staatsecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. V.L.W.A.  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 03 maart 2022  
**KENMERK** CGM/220303-01  
**ONDERWERP** Advies over protocol voor de detectie van replicatie-competent retrovirus

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 21-110\_2.8-001 met de titel 'Inschaling werkzaamheden met retrovirale vectoren' ingediend door het Academisch Ziekenhuis behorende bij de openbare universiteit Rotterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een nieuw protocol om retrovirus dat zich kan vermeerderen (replicatie-competent retrovirus; RCR) te detecteren. Het aantonen van de afwezigheid van RCR is vereist, om met gemodificeerde menselijke cellen die behandeld zijn (getransduceerd) met retrovirale vectoren op het laagste inperkingsniveau te mogen werken.

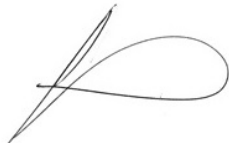
Het voorgestelde protocol bepaald de afwezigheid van RCR op basis van de activiteit van het virale enzym Reverse Transcriptase (RT), dat in RCR aanwezig is. RT enzymen zetten RNA-moleculen om in DNA-moleculen. Het protocol beschrijft een test waarbij RNA-moleculen worden toegevoegd aan de vloeistof waarin de cellen groeien (kweekvloeistof). Indien RCR aanwezig is zal het RT enzym het toegevoegde RNA omzetten in DNA; dit kan worden aangetoond door middel van een qPCR test. Het kweekvloeistof wordt op twee momenten getoetst: direct na de transductie van de cellen en een langere tijd na de transductie.

De COGEM merkt op dat het toetsen van het kweekvloeistof direct na transductie een goede positieve controle zou zijn dit protocol. De COGEM is van oordeel dat het voorgestelde protocol bij correct gebruik een geschikte methode is om RCR te detecteren in retroviraal getransduceerde menselijke cellen. De COGEM is van oordeel dat indien het kweekvloeistof van deze cellen in de qPCR test een resultaat geeft van Ct-waarde > 40, er op het laagste inperkingsniveau met deze cellen gewerkt kan worden. De COGEM merkt op dat zij de resultaten van een lopend onderzoek naar detectiemethoden voor RCR afwacht, alvorens generiek te adviseren over het gebruik van deze of vergelijkbare testen voor de detectie van RCR.



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. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo  
                  - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG  
                  Milieu en Internationaal

***Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn COGEM leden prof. dr. C.M.F.  
Dirven en dr. S. Herfst niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies***

# **Advies over een protocol voor de detectie van replicatie-competent retrovirus**

## **COGEM advies CGM/220303-01**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsverzoek (IG 21-110\_2.8) van een vergunning voor werkzaamheden met retroviraal getransduceerde cellen, afkomstig van het Academisch Ziekenhuis behorende bij de openbare universiteit Rotterdam. De aanvrager heeft al een beschikking om werkzaamheden met retroviraal getransduceerde cellen op een lager inperkingsniveau uit te voeren, van ML-II naar ML-I, op basis van onder andere de afwezigheid van replicatie-competent retrovirus (RCR). De aanvrager wil een protocol van een nieuwe assay aan de beschikking toevoegen om de afwezigheid van RCR aan te tonen. De aanvrager geeft aan de assay te willen gebruiken voor zowel de retroviraal getransduceerde cellen als voor de te gebruiken vectorbatch.

### **2. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2002 geadviseerd over het protocol van een assay welke tot nu toe door de aanvrager wordt gebruikt om de afwezigheid van RCR te testen. Deze assay wordt uitgevoerd met EGFP of G418-bevattend markervirus. De eventuele aanwezigheid van RCR kan door middel van fluorescentie of de groei van G418-resistente celklonen op antibioticum bevattend medium gedetecteerd worden.<sup>1</sup>

In 2021 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht, waarin voorwaarden zijn opgesteld voor het transduceren van cellen met (gamma)retrovirale vector batches en uitvoeren van werkzaamheden met retroviraal getransduceerde cellen op inperkingsniveau ML-I.<sup>2</sup> Deze voorwaarden betreffen: de te gebruiken cellijnen zijn van humane oorsprong en bewezen vrij van RCR, de te gebruiken vectorbatch voor transductie is vrij van RCR, er vindt een scheiding plaats tussen de werkzaamheden met cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten, en voor gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen dient aangetoond te zijn dat deze negatief zijn voor gammaretrovirussen. De aanvrager van deze vergunningswijziging dient ook aan deze voorwaarden te voldoen, om de werkzaamheden op ML-I te kunnen laten plaatsvinden.

### **3. Nieuw protocol: qPCR voor reverse transcriptase activiteit**

De aanvrager geeft aan dat de humane cellen die in de onderzoeksgroep gebruikt worden, nauwelijks te transfecteren zijn waardoor de gevoeligheid voor het aantonen van RCR volgens de huidige assay te laag is. Er is geen data aangeleverd die de lage gevoeligheid aantoont of toelicht. De aanvrager wil een nieuwe assay gebruiken om de afwezigheid van RCR aan te tonen in getransduceerde cellen en in de te gebruiken vectorbatch.

De nieuwe assay test of er RCR aanwezig is in het supernatant van getransduceerde cellen door de Reverse Transcriptase (RT) activiteit te bepalen, waarbij eventueel omgezet cDNA wordt bepaald met een qPCR. De assay is gebaseerd op de methode van Müller & Wirth.<sup>3</sup> Het supernatant wordt verzameld op de dag na de transductie (test sample 1), en op een later tijdstip wanneer de cellen een aantal keer

zijn doorgezet (test sample 2). Bij het doorzetten wordt het medium één keer per week verversd en wordt de celcultuur gesplitst indien nodig. Het protocol voor de nieuwe assay bestaat uit de volgende stappen:

- Het supernatant van de getransduceerde cellen wordt voorbehandeld met een buffer, gevolgd door bevroering in vloeibare stikstof en twee vries/dooi-cycli. Hierdoor lyseert eventueel aanwezig virus en komt het RT vrij in de oplossing.
- De activiteit van het virale RT wordt getoetst door RNA van de MS2-bacteriofaag en een bijbehorende primer toe te voegen. Het eventueel aanwezige RT zet het MS2-RNA om in cDNA. Als positieve controle wordt een reactie met het 'Moloney murine leukemia virus'-RT (MMLV; een gammaretrovirus binnen de species *Murine leukemia virus*) ingezet. Als negatieve controle wordt een reactie met enkel de buffer uitgevoerd.
- Met behulp van primers gericht op het MS2-cDNA, kan met een qPCR de hoeveelheid MS2-cDNA worden bepaald en daarmee de activiteit van het virale RT. In het protocol is aangegeven dat er bij 100 keer verlaging t.o.v. transductie (sample 2 versus sample 1), of indien er geen signaal is (Ct waarde > 40), de cellen het ML-II inperkingsniveau mogen verlaten naar ML-I.

In het protocol is vermeld dat 'de efficiëntie van de qPCR is getest op een ijklijn van MS2-bacteriofaag cDNA dat gemaakt is met een verdunningsreeks van MMLV-RT'.

Bij de aanvraag zijn geen data aangeleverd waarmee de gevoeligheid van de methode aangetoond wordt. In het artikel van Müller & Wirth<sup>3</sup> staat een ijklijn voor de RT van MLV (*Murine leukemia virus*) gepresenteerd, waarbij de MLV-RT concentratie is uitgezet tegen het aantal cycli (Ct-waarde). De auteurs geven aan dat het detectielimiet voor MLV-RT met hun methode  $1,5 \times 10^{-5}$  units / reactie zou zijn, en beredeneren dat daarmee 15.000-75.000 virusdeeltjes per reactie aangetoond kunnen worden.<sup>3</sup> De gevoeligheid van de methode verschilt voor andere virussen: de auteurs tonen aan dat de detectielimiet voor RT van Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) en Avian leukemia virus ligt op respectievelijk  $1,0 \times 10^{-7}$  units / reactie (960-4.800 virusdeeltjes) en  $1,4 \times 10^{-6}$  units / reactie (1.000-5.000 virusdeeltjes). De auteurs beredeneren dat het aantal infectieuze virusdeeltjes lager ligt. In het geval van MLV zou de methode minstens 2 tot 10 infectieuze virusdeeltjes kunnen detecteren.<sup>3</sup>

#### 4. Overweging

Het nieuwe protocol toont de afwezigheid van RCR aan op basis van de activiteit van viraal RT. RT is één van de essentiële eiwitten die nodig zijn in een virusdeeltje om te kunnen repliceren. De methode richt zich niet op een transgen of op een specifiek retrovirus, waardoor mogelijk ook onbekende en niet-voorspelde RCR's kunnen worden gedetecteerd. De methode is daarbij wel afhankelijk van de juiste condities voor het optimaal functioneren van het RT-enzym dat uit de RCR vrij wordt gemaakt. Een vergelijkbare PCR-assay om de RT activiteit te bepalen is voor het eerst beschreven in 1994 en wordt, met alle verbeteringen die sindsdien zijn aangebracht, voor vele onderzoeken gebruikt.<sup>4</sup>

##### 4.1 Positieve en negatieve controles

In het bijgevoegde protocol wordt MS2-RNA ingezet in een reactie met MMLV-RT als positieve controle, en de buffer uit de voorbehandeling als de negatieve controle. Een gedetailleerde beschrijving

van de controles ontbreekt. Zo is de hoeveelheid MMLV-RT waarmee de controle wordt uitgevoerd, niet gespecificeerd en is niet beschreven of het enzym dezelfde voorbehandeling ondergaat als het supernatant. Het gebruik van gezuiverd RT kan dienen als positieve controle voor de assay en voor het maken van een ijklijn, maar hoeft niet representatief te zijn voor de RT-activiteit in het supernatant na transductie. Het is niet duidelijk of de activiteit van het RT-enzym beïnvloed kan worden door de voorbehandeling.

In het protocol staat beschreven dat de RT-activiteit wordt gemeten in het supernatant op de dag na transductie (test sample 1) en na een aantal dagen en splitsingen (test sample 2). De COGEM merkt op dat het supernatant van de dag na transductie (test sample 1) een goede positieve controle zou zijn voor de gehele assay. Als alternatief zou een controle met een verdunning van de retrovirale vectorbatch in kweekmedium gebruikt kunnen worden.

#### *4.2 Ijklijn en gevoeligheid van de assay*

De aanvrager heeft geen eigen verworven data, zoals een ijklijn, aangeleverd bij het wijzigingsverzoek. In het artikel van Müller en Wirth<sup>3</sup> waar het nieuwe protocol op is gebaseerd, is een ijklijn van MLV-RT gepresenteerd. De COGEM merkt op dat de aanvragers bij het uitvoeren van hun protocol dienen na te gaan of dezelfde unit definitie wordt gebruikt als in het artikel van Müller en Wirth.

Hoewel de assay de RT-activiteit van alle retrovirussen zou kunnen detecteren, lijkt de gevoeligheid voor verschillende retrovirussen te verschillen. Het artikel van Müller en Wirth toont een lager detectielimiet voor de RT enzymen van HIV en Avian leukemia virus in vergelijking met MLV-RT. De auteurs Müller & Wirth beredeneren in hun artikel een vertaling van het aantal units per reactie, naar het aantal (infectieuze) virusdeeltjes. De COGEM merkt op dat dit echter gepaard gaat met een groot aantal aannames en daarom lastig is om vast te stellen.

#### *4.3 Afkapwaarden van de assay*

De aanvrager stelt in zijn protocol dat de afwezigheid van RCR bij de getransduceerde cellen is aangetoond indien er geen signaal is ( $Ct > 40$ ) of bij 100 keer verlaging t.o.v. transductie. De afkapwaarde van 100 keer verlaging t.o.v. transductie is niet toegelicht of onderbouwd door de aanvrager.

De COGEM merkt op dat bij het bepalen van de mate van verlaging t.o.v. transductie rekening gehouden dient te worden met het verdunnen van de celculturen. Een 100 keer verlaging t.o.v. van de inoculumconcentratie geeft geen informatie over de aanwezigheid van RCR, en de COGEM is van oordeel dat deze afkapwaarde niet kan worden gebruikt om te concluderen dat geen RCR aanwezig is.

Bij een  $Ct$ -waarde hoger dan 40 is er geen signaal waargenomen. Indien er RCR ontstaat zal dit na een aantal kweekstappen leiden tot een hoog aantal virussen die in deze assay een positief signaal afgeven, ver voor de 40<sup>ste</sup> qPCR cyclus. Bij een afkapwaarde van  $Ct > 40$  is de kans op een vals negatieve uitslag zeer klein.

#### *4.4 Vectorbatch*

De aanvrager geeft aan dat de qPCR methode, net als de eerder aangeleverde test, zal worden gebruikt om de afwezigheid van RCR in de retroviraal getransduceerde cellen én de te gebruiken vectorbatch aan

te tonen. De COGEM merkt op dat de vectorbatch RT-enzym zal bevatten en daardoor een positief signaal zal geven in de RT-gebaseerde test. Hierdoor kan een qPCR op basis van RT-activiteit niet gebruikt worden om aan te tonen dat de te gebruiken vectorbatch geen RCR bevat. Om te bepalen of RCR afwezig is in een vectorbatch dient men permissieve cellen te transduceren, die cellen enige tijd te passeren en vervolgens het supernatant te testen.

## 5. Advies

De COGEM is van oordeel dat het voorgestelde protocol voldoende gevoelig en geschikt is voor het aantonen van de afwezigheid van RCR in de getransduceerde humane cellen. Voor correct gebruik van dit protocol zijn echter een aantal aanpassingen vereist:

- De COGEM merkt op dat in het nieuwe protocol, het supernatant dat na transductie wordt verzameld (test sample 1) een goede positieve controle zal zijn, omdat deze dezelfde behandeling ondergaat als het supernatant verzameld na doorzetting van de cellen (test sample 2). Eventueel zou als positieve controle een verdunning van de retrovirale vectorbatch in kweekmedium gebruikt kunnen worden.
- In dit protocol kan bij een waarde  $Ct > 40$  in de qPCR assay geconcludeerd worden dat er geen RCR aanwezig is in het supernatant van de getransduceerde cellen. De COGEM is van oordeel dat een 100 keer verlaging t.o.v. transductie geen informatie geeft over de aanwezigheid van RCR en daardoor niet als afkapwaarde kan worden gebruikt in deze assay.
- De COGEM merkt op dat de aanvrager aangeeft de RT-qPCR assay in te gaan zetten voor het direct aantonen van RCR in de te gebruiken vectorbatch. Hoewel de assay geschikt is voor het aantonen van de afwezigheid van RCR in het supernatant van getransduceerde cellen, is de assay niet geschikt voor het direct testen van een vectorbatch. Hiervoor dient men permissieve cellen te transduceren met de vectorbatch, die cellen enige tijd te kweken en vervolgens het supernatant te testen, waarbij een positieve controle nodig is die laat zien dat een (vergelijkbaar) RCR gedetecteerd kan worden, dan wel op andere wijze zeer aannemelijk kan worden gemaakt dat dit het geval is.

Het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat het voorgestelde protocol, waarbij RT-activiteit in het supernatant van de getransduceerde celcultuur bepaald wordt middels een RT-qPCR assay,\* bij correct gebruik een valide methode is om RCR in retroviraal getransduceerde cellen te detecteren. Indien het supernatant van de getransduceerde humane cellen in deze test een resultaat geeft van  $Ct$  waarde  $> 40$ , kunnen deze cellen op ML-I gehanteerd worden.

## 6. Lopend onderzoeksproject

De COGEM is gevraagd door Bureau ggo of de assay zoals beschreven door de aanvrager, als een algemeen geaccepteerde, gevalideerde en als gevoelig aangemerkte methode kan worden gebruikt om

---

\* RT-qPCR is in deze context een qPCR assay waarmee de activiteit van retroviraal RT wordt bepaald door het toevoegen van een bekende concentratie RNA-moleculen. Dit is anders dan de veelgebruikte toepassing van RT-qPCR waarbij een bekende hoeveelheid RT-enzym gebruikt wordt om een onbekende concentratie RNA in een monster te kwantificeren.

RCR in retroviraal getransduceerde cellen te detecteren. De COGEM laat een onderzoeksproject uitvoeren waarin de detectiemethoden voor replicatie-competente retrovirussen (RCR) en lentivirussen (RCL) worden geïnventariseerd. De COGEM kan niet op de resultaten van het onderzoeksproject vooruitlopen en ziet daarom af van generieke uitspraken over het gebruik van dit protocol voor de detectie van RCR.

## **Referenties**

1. COGEM (2022). Identificatie en functionele karakterisering van genen verantwoordelijk voor de groeiconrole van menselijke cellen. COGEM advies CGM/020301-01
2. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
3. Müller K and Wirth M (2002). Real-time RT-PCR detection of retroviral contaminations of cells and cell lines. *Cytotechnology* 38: 147–153
4. Pyra H *et al.* (1994). Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1544–1548