

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 6 juli 2010  
**KENMERK** CGM/100706-01  
**ONDERWERP** Advies Classificatie en inschaling van Hepatitis B virus

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van de adviesvraag van Crucell Holland B.V. betreffende de classificatie in een pathogeniteitsklasse van *Hepatitis-B-virus* (HBV) en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HBV, adviseert de COGEM als volgt.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis-B-virus* (HBV). Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HBV (gg-HBV) ingeschaald dienen te worden.

Een HBV-infectie resulteert doorgaans in acute hepatitis maar kan ook een a-symptomatisch ziekteverloop hebben. Vijf tot 10% van de geïnfecteerde volwassenen ontwikkelt een persisterende infectie die kan leiden tot chronische hepatitis, levercirrose en leverkanker. Verspreiding van HBV vindt plaats via bloed-bloed contact, nauw onderling contact en verticale transmissie bij de geboorte. Hepatitis B is een seksueel overdraagbare aandoening. Daarnaast kunnen laboratoriuminfecties plaatsvinden door prik of snij-accidenten met besmette scherpe voorwerpen. Het HBV kan door middel van vaccinatie en behandeling met nucleos(t)iden analogen effectief bestreden worden.

Gezien de aard van het virus, de aanwezigheid van een effectief vaccin en effectieve therapie en het feit dat het virus zich niet gemakkelijk in de populatie verspreidt, adviseert de COGEM HBV te classificeren als een klasse 2 pathogeen.

De COGEM is van mening dat kloneringswerkzaamheden in *Escherichia coli* van het HBV-genoom of mutanten hiervan onder ML-I inperkingsniveau uitgevoerd dienen te worden.

Gebaseerd op de indeling van HBV in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM *in vitro* werkzaamheden met gg-HBV onder ML-II inperkingsniveau uit te voeren met in acht neming van aanvullende voorschriften. Om mogelijke transmissie van het virus te voorkomen dienen open handelingen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden. Daarnaast acht de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding en vaccinatie van de werknemers tegen HBV noodzakelijk.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Dr. I. van der Leij  
Drs. H.P. de Wijs

# Classificatie *Hepatitis B virus* en inschaling werkzaamheden genetisch gemodificeerd *Hepatitis B virus*

## COGEM advies CGM/100706-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie in een pathogeniteitsklasse van het *Hepatitis-B-virus* (HBV). Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd HBV (gg-HBV). De aanvraag is ingediend door Crucell Holland B.V. en is getiteld '*In vitro* expressie van *Hepatitis B virus*'.

Parallel aan deze aanvraag is de COGEM verzocht te adviseren over de classificatie van het *Hepatitis-delta-virus* (HDV) en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg) HDV. Ook deze aanvraag is ingediend door Crucell Holland B.V. Beide aanvragen worden met een apart advies behandeld.

De voorgenomen werkzaamheden in de huidige adviesvraag betreffen de *in vitro* productie van wildtype HBV of mutanten hiervan ten einde de infectiviteit te bepalen van verschillende HBV genotypes in aan- of afwezigheid van HBV neutraliserende antistoffen. Hieruit zal de neutraliserende activiteit van verschillende therapeutische antistofpanels bepaald worden. Tevens zullen virus-receptor interacties geanalyseerd worden.

### *Hepatitis B virus*

HBV behoort tot de familie *Hepadnaviridae*, genus *Orthohepadnavirussen*. Binnen het genus *Orthohepadnavirussen* worden verschillende species onderscheiden gebaseerd op gastheer tropisme.<sup>1</sup> Alleen zoogdieren worden geïnfecteerd. De natuurlijke gastheren van HBV zijn de mens en hogere primaten.<sup>1,2</sup>

*Hepadnaviridae* zijn deels dubbelstrengs DNA-virussen van ruim 3 kb.<sup>1</sup> De virale buitenmembraan bevat drie eiwitten: S, M en L. Hiervan is S, het 'Hepatitis B surface antigen' (HBsAg), het meest bekend. Binnen de virale membraan bevindt zich het nucleocapside dat het genoom bevat. In het nucleocapside membraan bevinden zich de 'Hepatitis B-core-' en 'HBe-antigenen' (respectievelijk HBcAg en HBeAg).<sup>2</sup>

Fenotypisch wordt HBV onderverdeeld in serotypes, gebaseerd op verschillen in het HBsAg.<sup>1</sup> Daarnaast bestaat er een onderverdeling gebaseerd op genotype.<sup>3</sup>

### *Hepatitis B*

De primaire infectie veroorzaakt door HBV vindt plaats via de parenterale route na contact met besmette lichaamsvloeistoffen: het virus dringt binnen door de beschadigde huid of via intacte slijmvliezen.<sup>2,4,5</sup> Voorbeelden van primaire infectie zijn 'bloed-bloed' contact ten gevolge van bloedtransfusie met besmette bloedproducten en prik- en snij-accidenten met HBV-besmet materiaal. Daarnaast speelt seksuele overdracht een belangrijke rol.<sup>4,5,7</sup> Ook verticale transmissie van moeder naar kind tijdens de geboorte is mogelijk.<sup>5</sup> Na infectie verspreidt HBV zich via het bloed door het lichaam. Door aanhechting aan specifieke receptoren wordt het virus opgenomen in de levercel.<sup>2</sup>

Een HBV-infectie resulteert meestal in acute hepatitis maar kan ook een a-symptomatisch ziekteverloop hebben. Het virus wordt door een groot deel van de geïnfekteerden geklaard. Wereldwijd zijn bijna 2 miljard mensen geïnfecteerd met HBV, waarvan meer dan 350 miljoen mensen een chronische HBV-infectie hebben. Een chronische HBV-infectie kan uiteindelijk leiden tot levercirrose en leverkanker.<sup>2,5</sup> Jaarlijks sterven naar schatting 1 miljoen mensen ten gevolge van een HBV infectie.<sup>2,6</sup>

Wereldwijd is de prevalentie van HBV sterk verschillend, afhankelijk van de geografische ligging.<sup>5</sup> In ontwikkelingslanden waar de levensstandaard laag is en beperkte medische zorg aanwezig is, is de prevalentie hoog. Hier vormen verticale transmissie en nauw onderling contact de belangrijkste manieren van overdracht.<sup>5</sup> In landen met een hoge levensstandaard, waaronder Nederland, is de prevalentie laag. In Nederland wordt hepatitis B voornamelijk verspreid door bloed-bloed contact en seksuele overdracht.

Hepatitis veroorzaakt door HBV behoort tot de meest frequent voorkomende laboratoriuminfecties.<sup>7</sup>

Vaccinatie is de meest effectieve strategie om infectie en verspreiding van HBV onder de bevolking te voorkomen. Sinds 1982 zijn Hepatitis-B-vaccins beschikbaar.<sup>5</sup> Wereldwijd zijn twee behandelstrategieën erkend om chronische hepatitis te behandelen, interferon  $\alpha$  en nucleos(t)ide analogen.<sup>8</sup>

### ***Classificatie***

Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.<sup>9</sup> Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse. De criteria zijn als volgt gedefinieerd:

- Een **indeling in pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
  - o het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
  - o het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
  - o 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;
  - o van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.
  
- Een **indeling in pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

- Een **indeling in pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.
- Een **indeling in pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

*Hepadnaviridae* worden volgens de lijst van pathogene micro-organismen en agentia (voormalig appendix A behorende bij de ‘Regeling genetisch gemodificeerde organismen’) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. HBV is niet apart als virus in de lijst opgenomen. De Duitse ‘Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit’ (ZKBS) heeft HBV ingedeeld in klasse 2.<sup>9</sup> Onder richtlijn 2000/54/EG van de Europese Gemeenschap is HBV ingedeeld als een klasse 3 pathogeen met de aanvullende opmerking dat HBV voor werknemers een beperkt besmettingsrisico oplevert omdat zij ‘normaal niet via de lucht besmettelijk is’.<sup>10</sup>

#### ***Inschaling werkzaamheden met Hepatitis B virus***

Door de ‘Public Health Agency of Canada’ en de ‘Belgian Biosafety Server’ worden werkzaamheden met HBV ingeschaald op BSL-2 niveau.<sup>11,12</sup> Werkzaamheden met grotere volumina HBV of hoog geconcentreerd HBV materiaal, en werkzaamheden die kunnen leiden tot aerosol- en druppelvorming, worden op BSL-3 niveau ingeschaald. De reden voor deze inschaling is niet duidelijk. Tevens is het niet duidelijk welke definitie beide organisaties gebruiken voor ‘grotere volumina’ en ‘hoog geconcentreerd materiaal’.

#### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft nog niet eerder advies uitgebracht over werkzaamheden met gg-HBV of andere virussen behorende tot het genus *Orthohepadnavirussen*. In het verleden is HBV geclassificeerd als pathogeen van klasse 2 (voormalig appendix A ‘lijst pathogene micro-organismen en agentia’). In 2009 heeft de ZKBS verschillende Europese biologische veiligheidscommissies gevraagd hun visie te geven over classificatie van HBV als zijnde een pathogeen behorende in klasse 2. In reactie hierop heeft de COGEM aangegeven HBV als een klasse 2 pathogeen te beschouwen.

#### **Werkzaamheden met gg-HBV**

Na klonering van HBV-genoom bevattende plasmiden (pHBV) in *Escherichia coli* zullen deze plasmiden in de vorm van expressievectoren getransfecteerd worden in humane cellijnen ten einde HBV-deeltjes te kunnen genereren. De expressievectoren zullen een compleet HBV-genoom of mutanten hiervan bevatten waardoor zowel wildtype virus als gemuteerd virus geproduceerd zal worden.

Tevens zullen verschillende humane cellijnen ge-cotransfecteerd worden met een genomisch HBV-construct waarin het HBsAg niet tot expressie kan komen (pHBV-L<sup>+</sup>M<sup>-</sup>S<sup>-</sup>) en met verschillende HBsAg expressievectoren (pHBsAg). In deze vectoren worden mutanten van het HBsAg tot expressie gebracht. Op deze wijze worden HBV deeltjes gegenereerd die wel cellen kunnen infecteren maar verder niet in staat zijn om te repliceren.<sup>13</sup>

Vervolgens zullen de verschillende soorten virusdeeltjes geogst worden en door middel van dichtheidsgradiëntcentrifugatie of heparinekolommen geconcentreerd en/of gezuiverd worden om HBV-titers te verhogen. Uiteindelijk zullen in aan- of afwezigheid van neutraliserende antistoffen humane levercellen geïnfecteerd worden met virusdeeltjes. Hierna zal HBV 'entry' gedetecteerd worden door middel van immunofluorescentie en door bepaling van de concentratie HBsAg/HBeAg in supernatant of van genomisch DNA in cellysaten.

Tijdens de werkzaamheden zal infectieus functioneel HBV gevormd worden. Echter, de werkzaamheden zullen alleen door HBV gevaccineerde personen uitgevoerd worden. De aanvrager geeft aan dat anti-HBV titers boven de 10 IU/ml voldoende bescherming bieden tegen HBV. Bij de beschreven handelingen wordt geen gebruik gemaakt van injectienaalden.

De aanvrager stelt voor om alle kloneringswerkzaamheden in *E. coli* onder ML-I inperkingsniveau uit te voeren en werkzaamheden waarbij productie zal plaatsvinden van wildtype HBV of gg-HBV deeltjes onder ML-II inperkingsniveau uit te voeren.

## **Overweging en advies**

### ***Classificatie HBV***

Een HBV-infectie resulteert doorgaans in acute hepatitis maar kan ook een a-symptomatisch ziekteverloop hebben. Vijf tot 10% van de geïnfecteerde volwassenen ontwikkelt een persisterende infectie die kan leiden tot chronische hepatitis, levercirrose en leverkanker.

Gezien de aard van het virus, de aanwezigheid van een effectief vaccin en effectieve therapie, en de beperkte verspreidingswijze van het virus via bloed-bloed contact, nauwe onderlinge contacten en seksuele overdracht, adviseert de COGEM HBV te classificeren als klasse 2 pathogeen.

### ***Inshaling werkzaamheden***

De constructen die nodig zijn voor het genereren van HBV deeltjes worden geproduceerd in *E. coli*. Tijdens de kloneringswerkzaamheden wordt er nog geen virus geproduceerd en komen er ook geen virale eiwitten tot expressie. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de kloneringswerkzaamheden op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden.

De aanvrager geeft aan alle *in vitro* werkzaamheden met gg-HBV onder ML-II inperkingsniveau uit te gaan voeren. Gebaseerd op de indeling van HBV in pathogeniteitsklasse 2 en conform de regeling GGO is de COGEM van mening dat de werkzaamheden met gg-HBV op inperkingsniveau ML-II uitgevoerd kunnen worden. Om de mogelijke transmissie van het virus te voorkomen, vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd moeten worden. Scherpe voorwerpen (naalden, glas, scalpels etc.) dienen uit de veiligheidskabinetten geweerd te worden. Daarnaast acht de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding noodzakelijk om te voorkomen dat het virus

via eventueel aanwezige wondjes het lichaam kan binnendringen. Tevens acht de COGEM vaccinatie van werknemers tegen HBV en controle op een afdoende antistof-titer noodzakelijk. Voor de analyse van de antistof-titer zijn in alle ziekenhuizen standaard procedures aanwezig.

De COGEM is van mening dat onder bovengenoemde inperkingsniveau's en door het hanteren van de aanvullende voorschriften de risico's van voorgenomen handelingen met het gg-HBV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Mason WS *et al.* (2005). The reverse transcribing DNA and RNA viruses. In: Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Fauquet CM *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam. 371-381
2. Ganem D and Schneider RJ (2001). *Hepadnaviridae*: The viruses and their replication. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 2923-3036
3. Valsamakis A (2007). Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clinical Microbial Reviews*. 20(3): 426-439
4. RIVM (2010). Infectieziekten A-Z. <http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/HepatitisB/index.jsp>
5. WHO (2002). Global Alert and Response Hepatitis. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/>
6. Lau JYN and Wright TI (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 342: 1335-1340
7. Sewell DL (1995). Laboratory-associated infections and biosafety. *Clinical Microbiological Reviews* 8(3): 389-405
8. Urban S *et al.* (2010). The replication cycle of *Hepatitis B virus*. *J. of Hepatology* 52: 282-284
9. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2009). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten
10. Publikatieblad van de Europese gemeenschappen. (2000). Richtlijn 2000/54/EG van het Europees parlement en de raad betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk. L 262/21-45
11. Public Health Agency of Canada (2001). [www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds78e-eng.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds78e-eng.php)
12. Belgian Biosafety Server (2008). [www.biosafety.be/PDF/2009\\_classification\\_lists/H\\_A\\_virus.pdf](http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf)
13. Ni Y *et al.* (2010). The Prc-S2 domain of the *Hepatitis B virus* is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *J. of Virology* 84(8): 3879-3888