

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

**DATUM** 4 maart 2010  
**KENMERK** CGM/100304-08  
**ONDERWERP** Advies: Classificatie van Chikungunya virus

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 05-034 met de titel 'Onderzoek aan flavi- en togavirussen en het ontwikkelen van vaccin kandidaten tegen deze virussen' van het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Chikungunya virus* (CHIKV). Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop laboratoriumwerkzaamheden met replicatiecompetente, genetisch gemodificeerde (gg-) CHIKV vectoren ingeschaald dienen te worden.

Het CHIKV veroorzaakt een ernstige ziekte, waarvoor geen vaccin of geneesmiddel bestaat. Over het algemeen is de infectie na enkele weken voorbij en de ziekte is niet levensbedreigend. Verspreiding van het CHIKV vindt van nature plaats via de tijgermug. Door import van de plant 'Lucky bamboe' is de tijgermug incidenteel in Nederland waargenomen. De COGEM kan niet uitsluiten dat de tijgermug zich in Nederland kan vestigen, waardoor de verspreiding van het CHIKV mogelijk wordt.

De COGEM adviseert het CHIKV in te delen in pathogeniteitsklasse 3. Gebaseerd op deze indeling kan zij ermee instemmen dat de voorgenomen kloneringswerkzaamheden op ML-II niveau uitgevoerd worden. De experimenten met gg-CHIKV vectoren in animale cellen en weefsels adviseert de COGEM op ML-III inperkingsniveau in te schalen. De laboratoriumwerkzaamheden met proefdieren adviseert zij op DM-III inperkingsniveau uit te voeren. Aangezien de COGEM aerogene transmissie van CHIKV onder laboratoriumomstandigheden niet kan uitsluiten, is zij van mening dat enkele aanvullende voorschriften nodig zijn om de kans op een besmetting van medewerkers via aerosolen te minimaliseren. Op genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus* 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 on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

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

# Classificatie van het *Chikungunya virus*

## COGEM advies CGM/100304-08

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Chikungunya virus* (CHIKV) en de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)CHIKV vectoren. De aanvrager, het Erasmus Universitair Medisch Centrum, vraagt een wijziging van vergunning IG 05-034 met de titel “Onderzoek aan flavi- en togavirussen en het ontwikkelen van vaccin kandidaten tegen deze virussen”. Het wijzigingsverzoek betreft onder andere het toevoegen van werkzaamheden met gg-CHIKV vectoren aan de bestaande vergunning.

### Alphavirussen

Het *Chikungunya virus* behoort tot het genus *Alphavirus* binnen de familie van de *Togaviridae*.<sup>1</sup> Het genus *Alphavirus* omvat tot op heden 28 verschillende virussoorten.<sup>2</sup> Ze worden allen verspreid via insecten en behoren daarmee tot de zogenaamde arbovirussen (arthropodborne viruses).

De alphavirussen worden op basis van de ziekteverschijnselen die ze veroorzaken, verdeeld in twee groepen: de virussen die koorts, huiduitslag en artritis veroorzaken, en virussen die tot encephalitis (hersenenontsteking) kunnen leiden. De eerste groep van virussen komt hoofdzakelijk voor in Europa, Azië en Afrika. De andere groep komt voornamelijk voor op het Amerikaanse continent.<sup>3</sup> Een deel van de alphavirussen is tot op heden niet geassocieerd met ziekte in mens of dier.

Alphavirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 12 kb. Het genoom wordt ingepakt in een icosahedrische mantel die wordt omgeven door een lipidemembraan. De virusdeeltjes zijn 60 tot 70 nm groot.

Het *Alphavirus* genoom codeert negen eiwitten, waarvan vier niet-structurele en vijf structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten worden gecodeerd door het 5'-uiteinde van het virus genoom. De coderende sequentie voor deze eiwitten beslaat tweederde deel van het gehele genoom. Het resterende deel, aan het 3'-uiteinde, codeert voor de vijf structurele eiwitten.<sup>1,4</sup> Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd ‘packaging’ signaal, dat noodzakelijk is om het genomisch RNA in te pakken in de eiwitmantel. De mantel wordt gevormd door het manteleiwit (C). Het lipidemembraan is afkomstig van de gastheercel en bevat onder andere twee glycoproteïnes (E1 en E2). De glycoproteïnes vormen een heterodimeer en zijn betrokken bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.

### Kenmerken van *Chikungunya virus*

Binnen enkele dagen na een infectie met het CHIKV manifesteren zich de eerste klinische symptomen. De ziekte kenmerkt zich onder andere door plotselinge hoge koorts, huiduitslag en

gewrichtspijn. Na enkele weken verdwijnt de infectie meestal, maar er zijn patiënten bekend die maanden of zelfs jaren last ondervinden van hun gewrichten.<sup>2,5</sup>

Tot op heden is er geen specifieke antivirale behandeling tegen een infectie met het CHIKV. Ook is er geen vaccin beschikbaar tegen het CHIKV. Er worden wel enkele kandidaat-vaccins getest in klinische studies.<sup>5</sup>

Het *Chikungunya virus* wordt door *Aedes* muggensoorten op de mens overgebracht. De *Aedes aegypti* is de primaire vector van CHIKV, maar ook de *Aedes albopictus* (Aziatische tijgermug) kan CHIKV op mensen overdragen.<sup>2,5</sup> In tegenstelling tot andere muggen is de tijgermug ook overdag actief en steekt zowel mensen als dieren meerdere malen om bloed op te zuigen. Tijdens een epidemie kan het CHIKV door de tijgermug van mens op mens worden overgedragen. Daarbuiten fungeren onder andere apen, knaagdieren en vogels als reservoirs van dit virus.

In Frankrijk, België en Zwitserland is *Aedes albopictus* geïntroduceerd via de import van oude autobanden, maar door gerichte maatregelen van deze landen lijkt de mug effectief bestreden. In Albanië, Griekenland, Spanje en Italië heeft de tijgermug zich echter gevestigd.<sup>6</sup> Dit heeft in de zomer van 2007 in Italië geleid tot een uitbraak van het CHIKV. De bron van de uitbraak was vermoedelijk één besmette reiziger uit India. Er zijn in totaal 254 mensen ziek geworden, waarvan er elf in het ziekenhuis zijn opgenomen en één is overleden.<sup>7</sup> De overleden patiënt was ernstig verzwakt door een andere aandoening. Over het algemeen is een infectie met CHIKV echter niet levensbedreigend.

### **Classificatie**

In de Regeling ggo worden 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.<sup>8</sup> Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse.

Virussen behorend tot de *Togaviridae* worden volgens de lijst van pathogene micro-organismen en agentia (Appendix A) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>9</sup> Het *Semliki forest virus*, *Sindbisvirus* en het *Rubellavirus* vormen hierop een uitzondering. Deze drie Togavirussen worden beschouwd als pathogeniteitsklasse 2 virussen.

### **Eerdere COGEM adviezen**

In het verleden heeft de COGEM een aantal maal geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatie deficiënte gg-alphavirussen. Het betrof laboratoriumwerkzaamheden met gg-*Semliki forest virus*, op *Venezuelan equine encephalitis virus* gebaseerde 'null-replicon' deeltjes en een chimere alphavirus vector gebaseerd op het *Sindbis virus* en het *Venezuelan equine encephalitis virus*.<sup>10-14</sup> Voor deze gg-alphavirussen heeft de COGEM geadviseerd de *in vitro* werkzaamheden op ML-II niveau in te schalen en de *in vivo* werkzaamheden op DM-II niveau.

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus*.

## Overweging en advies

### *Classificatie van Chikungunya virus*

Het CHIKV veroorzaakt bij mensen een ernstige ziekte, waarvoor tot op heden nog geen profylaxe of therapie beschikbaar is. De huidige behandeling van patiënten met een CHIKV infectie komt voornamelijk neer op het bestrijden van de symptomen, die een infectie met CHIKV teweeg brengt.

Tot enkele jaren geleden kwamen de tijgermuggen die CHIKV over kunnen brengen niet in Nederland voor. Door de import van zogenaamde ‘Lucky bamboo’ planten zijn sinds 2005 incidenteel tijgermuggen aangetroffen bij de Nederlandse importeurs van deze planten.<sup>6,15</sup> De zomertemperaturen in Nederland zijn geschikt voor de overleving van volwassen muggen en voor een succesvolle reproductie. Ook tegen relatief lage wintertemperaturen lijkt de tijgermug bestand, zoals valt af te leiden uit de vestiging van deze muggensoort in Noord-Amerika, Noord-Japan en Noord-Italië.<sup>6</sup> De COGEM kan derhalve niet uitsluiten dat de tijgermug zich ook in het Nederlandse klimaat kan handhaven, waardoor verspreiding van CHIKV in Nederland mogelijk zou worden.

Werkzaamheden met CHIKV worden door het ‘Centers for Disease Control and Prevention’ (CDC) op basis van waargenomen laboratoriuminfecties ingeschaald op Biosafety Level 3.<sup>16</sup>

Gezien de aard van de ziekte, de afwezigheid van een vaccin of therapie en het feit dat niet uitgesloten kan worden dat de vector zich in het Nederlandse klimaat kan handhaven en verspreiden, adviseert de COGEM het CHIKV in te delen in pathogeniteitsklasse 3.

### *Inschaling van werkzaamheden met gg-CHIKV*

De aanvrager is voornemens replicatie competente gg-CHIKV vectoren te produceren en deze in *in vitro* en *in vivo* experimenten te gebruiken. De vectoren bevatten het volledige genoom van CHIKV al dan niet in aanwezigheid van het gen dat codeert voor het zogenaamde ‘Green Fluorescent Protein’ (GFP). De introductie van GFP resulteert in een beperkte afname van de vermeerdering van betreffende gg-CHIKV vectoren.<sup>17</sup> Het geïntroduceerde GFP gen is niet of nauwelijks van invloed op de mate waarmee *Aedes albopictus* na een bloedmaal met betreffende vectoren besmet raakt. Gedurende opeenvolgende passages van de gg-CHIKV vectoren met GFP is een verlies van GFP expressie te zien. Dit wordt toegeschreven aan de genetische instabiliteit van deze gg-CHIKV vectoren.<sup>17</sup> De COGEM beschouwt de gg-CHIKV vectoren derhalve als vol virulent.

Gebaseerd op de indeling van CHIKV in pathogeniteitsklasse 3 en conform de regeling GGO kan de COGEM instemmen met de inschaling van de voorgenomen kloneringswerkzaamheden op inperkingsniveau ML-II. Daarnaast adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met animale cellijnen, cellen en weefsels op ML-III niveau en de handelingen met proefdieren in associatie met gg-CHIKV op DM-III niveau in te schalen.

Het CHIKV wordt van nature verspreid door de *Aedes* mug. Voor een vergelijkbaar alphavirus, het zogenaamde *Venezuelan equine encephalitis virus* is een aantal gevallen bekend waarbij onder laboratoriumomstandigheden aerogene verspreiding heeft plaatsgevonden.<sup>3</sup> Ook voor het CHIKV wordt in de wetenschappelijke literatuur melding gemaakt van aerogene transmissie.<sup>3</sup> Mede gebaseerd op deze transmissie route heeft het CDC de werkzaamheden met CHIKV ingeschaald op BSL-3 niveau.<sup>16</sup> Met het oog op deze gegevens en gezien de hoge concentraties CHIKV waarmee onder laboratoriumomstandigheden gewerkt kan worden, kan het risico op aerogene besmetting van de medewerker met gg-CHIKV vectoren tijdens voorgenomen werkzaamheden niet uitgesloten worden. Gezien deze kans op aerogene transmissie van het gg-CHIKV adviseert de COGEM bij de *in vitro* werkzaamheden alle open handelingen in een veiligheidskabinet klasse-II uit te voeren. Om de mogelijke aerogene besmetting als gevolg van handelingen met proefdieren in associatie met het gg-CHIKV te minimaliseren, adviseert de COGEM de dieren te huisvesten in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter.

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

## Referenties

1. Weaver SC *et al.* (2000). *Family Togaviridae*. In: Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Van Regenmortel, M.H.V. *et al.* Academic Press, San Diego. 879-889
2. Pialoux G *et al.* (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7:319-327
3. Griffin DE (2001). Alphaviruses. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 917-962
4. Schlesinger S and Schlesinger MJ (2001). *Togaviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 895-916
5. Cavrini F *et al.* (2009) Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. *J. Infect. Dev. Ctries* 3: 744-752
6. Jager MM *et al.* (2008) Import van de tijgermug, risico voor volksgezondheid? *Infectieziekten Bulletin* 19:108-112
7. World Health Organization (2 maart 2010) [http://www.euro.who.int/surveillance/outbreaks/20070904\\_1](http://www.euro.who.int/surveillance/outbreaks/20070904_1)
8. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. (2004)
9. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij de Regeling (1998)
10. COGEM (2003). Combinatie vaccines voor HIV-1. (CGM/030604-02)
11. COGEM (2004). Constructie en productie van alphavirusvectoren. (CGM/040212-02)
12. COGEM (2006). Vaccinatie van apen met recombinante chimere alphavirusvectoren ten behoeve van vaccinonderzoek. (CGM/060314-01)

13. COGEM (2007). *Semliki forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. (CGM/070723-02)
14. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes (CGM/090603-01)
15. Takken W & Jacobs F (2008) Estimates of public health risks by import of *Aedes albopictus* through *Dracaena*'s in the Netherlands. Project TRC 2005/2867
16. Centers for Disease Control and Prevention (2 maart 2010) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb14/bmb14toc.htm>
17. Tsetsarkin K *et al.* (2006). Infectious clones of *Chikungunya virus* (La Réunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6: 325-337