



Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 28 oktober 2010
KENMERK CGM/101028-04
ONDERWERP Advies: Classificatie van vijf alphavirussen

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 10-018 met de titel 'Moleculaire biologie van alphavirussen en hun interacties met de gastheer' van het Leids Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van verschillende alphavirussen uit de familie *Togaviridae*. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop *in vitro* en *in vivo* laboratoriumwerkzaamheden met deze genetisch gemodificeerde (gg-) alphavirussen ingeschaald dienen te worden. Het betreft de virussen *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Ross River virus* (RRV), *Salmon pancreas disease virus* (SPDV), *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV) en *Western equine encephalitis virus* (WEEV).

De virussen kunnen dieren, mensen of vissen infecteren en worden met uitzondering van SPDV overgedragen door muggen. Mens op mens transmissie komt niet voor. Ziekte door infectie kan tot de dood leiden in het geval van VEEV, EEEV en WEEV. Er is geen therapie mogelijk bij ziekte anders dan pijnbestrijding en vaccins voor mensen zijn nog niet op de markt. ONNV, RRV, VEEV, EEEV en WEEV zijn niet inheems in Europa.

VEEV is eerder door de COGEM ingeschaald als een klasse 3 pathogeen en de COGEM ziet geen aanleiding deze inschaling te herzien. De COGEM adviseert EEEV en WEEV op basis van de ernst van de ziekte, de afwezigheid van therapie of profylaxe en de mogelijkheid dat de virussen zich kunnen verspreiden in Nederland in te schalen in pathogeniteitsklasse 3. Naar de mening van de COGEM zijn ONNV en RRV klasse 2 pathogenen. SPDV is een dierpathogeen, en wordt door de COGEM ingeschaald als een klasse 2 pathogeen.

Gebaseerd op de classificatie van de alphavirussen stemt de COGEM in met de voorgestelde inschaling van de voorgenomen werkzaamheden. Voor werkzaamheden met replicatiecompetente gg-alphavirusdeeltjes in animale cellen en weefsels adviseert de COGEM aanvullende voorschriften in te stellen.

Op genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van aanvullende voorschriften beschreven in het advies is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met gg-ONNV, gg-RRV, gg-SPDV, gg-VEEV, gg-EEEV en gg-WEEV 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 stroke that ends in a small hook.

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

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

Classificatie van vijf alphavirussen

COGEM advies CGM/101028-04

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van vijf alphavirussen en de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) virusdeeltjes gebaseerd op alphavirussen. De aanvrager, het Leids Universitair Medisch Centrum, vraagt om een wijziging van vergunning IG 10-018 met de titel ‘Moleculaire biologie van alphavirussen en hun interacties met de gastheer’. Het wijzigingsverzoek betreft onder andere het toevoegen van werkzaamheden met volvirulente, nog niet eerder geclassificeerde gg-alphavirussen aan de bestaande vergunning.

1.1 Alphavirussen

Het genus *Alphavirus* behoort tot de familie van de *Togaviridae*. Het genus *Alphavirus* omvat tot op heden 29 verschillende virussoorten.¹ Ze worden nagenoeg allemaal verspreid via insecten en behoren daarmee tot de zogenaamde arbovirussen (‘arthropod borne 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.² 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.^{1,3} 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.

1.2 Kenmerken van *O’nyong-nyong virus* (ONNV)

Het *O’nyong-nyong virus* (ONNV) is tot op heden alleen aangetroffen in Oost Afrika, waar het in 1959 een epidemie veroorzaakte onder de bevolking in Uganda en omstreken.² Met meer dan twee miljoen zieken was het een van de grootste epidemieën die ooit door een arbovirus zijn

veroorzaakt, hoewel niemand is overleden aan de ziekte.^{4,5} Nadat ONNV 35 jaar lang geen ziekte had veroorzaakt, brak er in 1996 een tweede ONNV epidemie uit in Uganda.^{2,4}

Er zijn geen andere gastheren of reservoirs bekend voor ONNV dan de mens.⁶ Tijdens ziekte wordt ONNV niet direct overgedragen van mens op mens.⁶ Transmissie van ONNV naar de mens wordt gemedieerd door *Anopheles* muggen, voornamelijk *A. gambiae* en *A. funestus*.^{2,7} Deze muggen komen niet in Nederland voor.⁸ In Canada zijn voor 1980 twee laboratoriuminfecties met ONNV gemeld.⁹ Het is niet duidelijk hoe infectie heeft plaatsgevonden bij deze gevallen.

Een infectie met ONNV kan zonder symptomen verlopen. Het eerste verschijnsel van ziekte door ONNV is koorts na acht of meer dagen.⁹ Karakteristieke symptomen zijn pijnlijke gewrichten, huiduitslag, ontstoken lymfeklieren en bindvliesontsteking.² De symptomen houden ongeveer een week aan waarbij bijna alle patiënten bedlegerig zijn. De patiënten herstellen volledig.² Er is geen profylacticum tegen ONNV. Pijnbestrijding is mogelijk, maar de ziekte kan verder niet behandeld worden.⁹

1.3 Kenmerken van Ross River virus (RRV)

Het *Ross River virus* (RRV) is het arbovirus dat de meeste ziektegevallen onder de bevolking veroorzaakt in Australië. RRV is inheems in de kustgebieden van Noord- en Centraal Australië en komt daarnaast voor in de rest van Australië en eilanden in het zuiden van de Grote Oceaan.² RRV kan buideldieren, andere zoogdieren (waaronder de mens) en vogels infecteren.^{2,9} Het virus veroorzaakt echter slechts in een beperkt aantal organismen, namelijk mens, paard en muis, symptomen.¹⁰ RRV wordt overgedragen door *Aedes* muggensoorten (*Ae. camptorhynchus*, *Ae. notoscriptus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. vigilax*) en *Culex annulirostris*.^{2,9} Deze muggen komen niet in Nederland, met het huidige Nederlandse klimaat, voor.⁸

Geschat wordt dat jaarlijks 0,4% tot 2,4% van de bevolking in Noord- en Centraal Australië geïnfecteerd wordt. Vooral 30 tot 40 jarigen worden getroffen door RRV. Bij kinderen is ziekte door infectie met RRV zeldzaam.² Er zijn geen gevallen bekend waarbij het virus van mens op mens werd overgedragen.⁹

Infectie met het virus veroorzaakt na ongeveer acht dagen koorts, gewrichtspijn, gewrichtsontsteking en/of huiduitslag.^{2,9} De gemiddelde ziekteduur is zes maanden, maar de gewrichtsklachten kunnen langer aanhouden. 95% van de patiënten is binnen twee jaar volledig genezen.¹¹ In sommige gevallen blijken de symptomen echter ook drie jaar na het begin van de infectie nog aanwezig.⁴ Een vaccin tegen RRV is op dit moment in ontwikkeling.¹² Er is geen specifieke behandeling voor RRV infectie, anders dan symptoombestrijding.⁹ Er zijn geen gevallen bekend waarbij laboratoriummedewerkers besmet zijn geraakt met RRV.²

1.4 Kenmerken van Eastern equine encephalitis virus (EEEV)

Eastern equine encephalitis virus (EEEV) is een virus dat voorkomt in Zuid- en Noord-Amerika en mensen, paarden, andere zoogdieren en vogels kan infecteren.² De primaire cyclus van het virus vindt plaats tussen vogels en muggen (*Culiseta melanura*). Transmissie naar paarden en mensen gaat voornamelijk via *Aedes*, *Coquillettidia* and *Culex* muggensoorten die zowel

parasiteren op vogels als paarden en mensen.¹³ De ziekte is niet overdraagbaar van mens op mens.⁹

EEEV is waarschijnlijk de meest virulente van de encefalitische alphavirussen en kan encefalitis (ontsteking van het hersenweefsel) veroorzaken met sterfte tot gevolg. Na vier tot vijftien dagen incubatietijd zijn de symptomen van een mild verloop van de ziekte één of twee weken koorts, malaise en spierpijn. De eerste symptomen van een encefalitis zijn hoge koorts, spierpijn en een toenemende hoofdpijn. Binnen twee tot tien dagen kan hierbij de patiënt overlijden. Kinderen jonger dan tien jaar zijn het meest vatbaar voor encefalitis door infectie met EEEV. Een nasleep van de ziekte komt vaak voor, met neurologische verschijnselen zoals verlamming, insults en geestelijke handicaps. Het aantal sterftegevallen onder mensen met EEEV wordt in oudere studies geschat op 65%, en op 35% in meer recente studies.²

In de Verenigde Staten hebben zich tussen 1964 en 2004 220 bevestigde gevallen van EEEV infectie bij mensen voorgedaan.¹³ Volgens het CDC zijn er tegenwoordig jaarlijks gemiddeld zes personen met een EEEV infectie.¹⁴ In Canada zijn vier laboratoriuminfecties gemeld.⁹ Er zijn veterinaire vaccins tegen EEEV die experimenteel worden ingezet bij laboratoriummedewerkers in de VS.² Andere vaccins zijn in ontwikkeling.¹³ Er is geen specifieke behandeling beschikbaar bij EEEV infectie, anders dan symptoombestrijding.⁹

1.5 Kenmerken van Western equine encephalitis virus (WEEV)

Western equine encephalitis virus (WEEV) is een virus dat voorkomt in Zuid- en Noord-Amerika en mensen, paarden, andere zoogdieren en vogels kan infecteren. WEEV wordt in stand gehouden via een cyclus tussen de natuurlijke gastheer, zangvogels, en de bijbehorende transmissievector, de mug *Culex tarsalis*. Transmissie naar paarden en mensen wordt gemedieerd door de muggen *Ochlerotatus melanimon*, *Aedes dorsalis* en *Aedes campestris*.¹³ De ziekte is niet overdraagbaar van mens op mens.⁹

Infectie met WEEV leidt doorgaans tot een asymptomatisch verloop of milde ziekte.¹⁵ In een beperkt aantal gevallen kan de ziekte een ernstig verloop hebben. Ziekten hebben eerst algemene verschijnselen, vergelijkbaar met EEEV infectie. In een minderheid van de geïnfecteerden kan ontsteking van het hersenweefsel en/of het ruggenmerg voorkomen. Geschat wordt dat 3 tot 7% van de gevallen eindigt in een overlijden.¹³ In zeer jonge kinderen leidt infectie met WEEV vaker tot ziekte, waarbij de ziekte ook vaker een ernstig verloop kent met een blijvende neurologische nasleep.²

In de Verenigde Staten hebben zich tussen 1964 en 2005 639 bevestigde gevallen van WEEV infecties bij mensen voorgedaan. Sinds 1994 zijn er geen gevallen meer gemeld in de VS.² In Canada zijn zeven laboratoriuminfecties gemeld, waarvan twee personen zijn overleden.⁹ Er is een geïnactiveerd vaccin beschikbaar tegen WEEV in paarden, dat experimenteel gebruikt wordt bij laboratoriummedewerkers in de VS.² Andere vaccins zijn in ontwikkeling.¹³ Er is geen specifieke behandeling beschikbaar bij WEEV infectie, anders dan symptoombestrijding.⁹

1.6 Kenmerken van Salmon pancreas disease virus (SPDV)

Het *Salmon pancreas disease virus* (SPDV) is geïsoleerd uit de zalmsoort *Salmo salar* L. in 1995 en is daarmee het eerst beschreven alphavirus in vissen.¹⁶ Samen met de later ontdekte virussen *Sleeping disease virus* en *Norwegian salmonid alphavirus* vormt SPDV een genetisch losstaande groep binnen de alphavirussen. SPDV wordt ook wel *Salmonid alphavirus 1* genoemd. De aquatische alphavirussen komen voor bij gekweekte zalm en forel in West-Europa en Noord-Amerika.¹⁶

SPDV veroorzaakt alvleesklierziekte bij gekweekte Atlantische of Noorse zalm. Doorgaans worden zalmen in hun eerste jaar in de zee getroffen door de ziekte. Zieke zalmen eten minder, zijn futloos en er is een toename in uitwerpselen in hun kooien te zien. Alvleesklierziekte heeft in verschillende uitbraken in Ierland een mortaliteit veroorzaakt van 1% tot 48%.¹⁶ Een geïnactiveerd vaccin tegen alvleesklierziekte (Norvax compact PD) is beschikbaar.

Voor SPDV is geen geleedpotige transmissievector bekend, zoals voor de overige alphavirussen. Als mogelijke vector of reservoir zijn bloedzuigende kreeftachtigen zoals zeeluzen gesuggereerd.¹⁶ Transmissie kan echter direct tussen vissen plaatsvinden,¹⁷ en het virus kan meer dan twee maanden in steriel zeewater bij lage temperaturen overleven.¹⁸

Er zijn geen gevallen bekend van infecties van SPDV bij mensen of andere gewervelden dan vissen.

2. Eerdere COGEM adviezen

In het verleden heeft de COGEM een aantal maal geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatiedeficiënte 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*.^{19,20,21,22,23} 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. *Venezuelan equine encephalitis virus* is in deze adviezen ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3.²³

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd het alphavirus *Chikungunya virus* in te schalen in pathogeniteitsklasse 3.²⁴ Hieruit volgt dat kloneringswerkzaamheden met replicatiecompetent *Chikungunya virus* worden vergund op ML-II inperkingsniveau en *in vitro* en *in vivo* handelingen op ML-III en DM-III niveau. Om het risico op aerogene besmetting te minimaliseren, zijn aanvullende voorschriften geadviseerd. Ook heeft de COGEM in 1998 geadviseerd *Salmon pancreas disease virus* in te schalen in pathogeniteitsklasse 2, omdat het virus een dierpathogeen betrof.²⁵

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met *O'nyong-nyong virus*, *Ross River virus*, *Eastern equine encephalitis virus* en *Western equine encephalitis virus*.

3. Overweging en advies: 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.²⁶ 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 (voormalig appendix A) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁷ Het *Semliki forest virus*, *Sindbisvirus* en het *Rubellavirus* vormen hierop een uitzondering. Deze drie Togavirussen worden beschouwd als pathogeniteitsklasse 2 virussen.

3.1 Classificatie van *O'nyong-nyong virus* en *Ross River virus*

ONNV en RRV infectie kunnen bij de mens gewrichtspijn en huiduitslag veroorzaken, maar leiden niet tot sterfte. Genezing is volledig na een infectie met ONNV en vrijwel altijd volledig na infectie met RRV. Er zijn op dit moment geen profylaxes of therapieën beschikbaar tegen de virussen anders dan symptoombestrijding. Voor RRV is echter een vaccin in ontwikkeling, dat in 2007 preklinische testen heeft ondergaan.²⁸

Beide virussen zijn niet inheems in Nederland of Europa. De virussen worden overgedragen door muggen die niet in Nederland voorkomen. Transmissie van mens op mens is niet bekend. Voor RRV zijn geen laboratoriuminfecties bekend, maar voor ONNV zijn in Canada twee laboratoriuminfecties gemeld. Vorming van aerosolen in het laboratorium en prikaccidenten worden door de Canadese Public Health Agency als mogelijke risicofactoren gezien bij handelingen met de virussen.⁹ Gezien het feit dat de transmissievector ontbreekt in Nederland en dat de virussen niet overdraagbaar zijn tussen mensen, kan verspreiding van ONNV en RRV na een laboratoriuminfectie als onwaarschijnlijk beschouwd worden. Indien een transmissievector voor ONNV en RRV zich in Nederland vestigt, zal de COGEM de classificatie van de virussen opnieuw in overweging nemen.

Werkzaamheden met ONNV en RRV worden door het Amerikaanse 'Centers for Disease Control and Prevention' (CDC) ingeschaald op Biosafety Level 2.¹⁴

Gezien de aard van de ziektes veroorzaakt door ONNV en RRV en de afwezigheid van transmissievector in Nederland voor de virussen, adviseert de COGEM ONNV en RRV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

3.2 Classificatie van *Eastern equine encephalitis virus*, *Western equine encephalitis virus* en *Venezuelan equine encephalitis virus*

EEEV en WEEV komen voor in Zuid- en Noord-Amerika bij verschillende zoogdieren en de mens. De virussen kunnen ernstige ziekte veroorzaken met blijvende neurologische schade of sterfte tot gevolg. Op dit moment zijn geen vaccins voor de mens beschikbaar. Wel wordt er geëxperimenteerd met vaccinatie van laboranten met veterinaire vaccins in de VS en er zijn humane vaccins in ontwikkeling. Er is geen specifieke behandeling mogelijk bij infectie met EEEV en WEEV, anders dan bestrijding van de symptomen.

EEEV en WEEV zijn niet inheems in Nederland of Europa. De virussen worden overgedragen door verschillende muggen, waaronder *Aedes* en *Culex* soorten. De meeste van deze muggen komen niet voor in Nederland.⁸ WEEV is echter geïsoleerd uit twee muggensoorten die veelvoorkomend zijn in Europa en Nederland, *Culex pipiens* en *Aedes vexans*.²⁹ Verschillende

zoogdieren zouden als reservoir voor beide virussen kunnen fungeren in Europa. De voorwaarden voor een transmissiecyclus van deze virussen zijn daarmee in principe aanwezig in Europa. Het is echter onduidelijk of de virussen zich daadwerkelijk kunnen vestigen.²⁹

EEEV en WEEV zijn niet overdraagbaar van mens op mens. In Canada zijn voor beide virussen laboratoriuminfecties gemeld. Vorming van aerosolen in het laboratorium en prikaccidenten worden door de Canadese Public Health Agency als mogelijke risicofactoren gezien bij handelingen met de virussen.⁹ Werkzaamheden met EEEV en WEEV worden door het Amerikaanse 'Centers for Disease Control and Prevention' (CDC) ingeschaald op Biosafety Level 3.¹⁴

Concluderend kan de COGEM niet uitsluiten dat verspreiding van de virussen in Nederland plaats zou kunnen vinden na een laboratoriuminfectie. Mede gezien de mogelijkheid dat de virussen zich in Europa kunnen vestigen en verspreiden, de aard van de ziekte veroorzaakt door EEEV en WEEV en de afwezigheid van therapie en profylaxe, adviseert de COGEM om EEEV en WEEV in te delen in pathogeniteitsklasse 3.

Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) is eerder door de COGEM ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3. De COGEM ziet gezien de biologische karakteristieken van het virus geen reden om deze inschaling te herzien.

3.3 Classificatie van het *Salmon pancreas disease virus*

SPDV veroorzaakt alvleesklierziekte en sterfte bij gekweekte zalm. Het virus heeft een zeer beperkt gastheerbereik. Er is een commercieel vaccin beschikbaar tegen het virus. Er zijn geen gevallen bekend waarbij mensen geïnfecteerd zijn met SPDV. SPDV wordt daarom beschouwd als een dierpathogeen en niet als potentieel zoönotisch diervirus.³⁰

Mede gezien de biologische karakteristieken en het beperkte gastheerbereik van SPDV, ziet de COGEM geen reden om de eerder geadviseerde inschaling van SPDV in pathogeniteitsklasse 2 te wijzigen.

4. Overweging en advies: voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil de moleculaire biologie, replicatie en pathogenese van alphavirussen bestuderen. Met name wil hij de rol van gastheerfactoren in de replicatie en pathogenese van alphavirussen onderzoeken om uiteindelijk nieuwe antivirale behandelingen te ontwikkelen tegen alphavirussen. De aanvrager is van plan gehele virale genomen, defectieve virale genomen en individuele genen van alphavirussen te kloneren voor expressie in animale cellen en insectencellen. Hiervoor zullen cDNA kopieën van gehele virale genomen, virussen met reporter genen en replicons waaruit de structurele virale genen zijn verwijderd gemaakt worden.

De aanvrager heeft op dit moment een vergunning voor bovenstaande werkzaamheden met drie genetisch gemodificeerde alphavirussen, namelijk *Semliki Forest virus*, *Sindbis virus* en *Chikungunya virus*. Aan deze vergunning wil hij werkzaamheden met volledige en defectieve virale genomen van de volgende zes alphavirussen toevoegen; *O'nyong-nyong virus*, *Ross River*

virus, Salmon pancreas disease virus, Venezuelan equine encephalitis virus, Eastern equine encephalitis virus en *Western equine encephalitis virus*.

4.1 Inschaling van werkzaamheden met gg-ONNV en gg-RRV

Gebaseerd op de indeling van ONNV en RRV in pathogeniteitsklasse 2 en conform de regeling GGO adviseert de COGEM kloneringswerkzaamheden in gist en *Escherichia coli* op inperkingsniveau ML-I uit te voeren. Daarnaast adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met animale cellijnen, cellen en weefsels op ML-II niveau in te schalen indien volvirulente gg-virussen kunnen worden gevormd. Hierbij stelt de COGEM als aanvullend voorschrift dat open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd moeten worden, en dat het dragen van handschoenen verplicht is.

De aanvrager zal ook werken met gg-virussen, waaruit de structurele genen verwijderd zijn. Bovendien zal de aanvrager virale ONNV- en RRV-genomen zonder structurele genen combineren met andere virale gensequenties. Voorwaarde hierbij is, dat productie van deze virussen in animale cellen niet mag leiden tot volvirulent virus. Daarnaast moet het gastheermateriaal voor transfectie vrij zijn van alphavirussen om te voorkomen dat complementatie van de deleties plaats kan vinden. Onder deze voorwaarden kunnen transfectie en handelingen met gg-ONNV en gg-RRV plaatsvinden op ML-I inperkingsniveau.

4.2 Inschaling van werkzaamheden met gg-EEEV, gg-WEEV en gg-VEEV

Gebaseerd op de indeling van de drie '*equine encephalitis virussen*' in pathogeniteitsklasse 3 en conform de regeling GGO is de COGEM van mening dat de voorgenomen kloneringswerkzaamheden in gist en *E. coli* met individuele genen en partiële genomen van EEEV, WEEV en VEEV die replicons genereren zonder structurele eiwitten op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd moet worden. Expressie van deze genen en defectieve replicons van EEEV, WEEV of VEEV in animale cellen adviseert de COGEM op ML-II inperkingsniveau plaats te laten vinden. Als aanvullend voorschrift stelt de COGEM dat bij werkzaamheden in animale cellen het te gebruiken gastheermateriaal vrij moet zijn van complementerende alphavirussen.

De COGEM stemt in met de klonering van volledige genomen van gg-EEEV, -WEEV en -VEEV in gist en *Escherichia coli* op inperkingsniveau ML-II. Daarnaast adviseert de COGEM de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met animale cellijnen, cellen en weefsels op ML-III niveau in te schalen. Voor zowel EEEV, WEEV als VEEV zijn een aantal gevallen bekend waarbij onder laboratoriumomstandigheden infectie van mensen heeft plaatsgevonden. Aerogene verspreiding is bekend voor VEEV.³ Vorming van aerosolen in het laboratorium wordt ook als mogelijke risicofactor gezien bij handelingen met EEEV en WEEV. Met het oog op deze gegevens en gezien de hoge concentraties virus waarmee onder laboratoriumomstandigheden gewerkt kan worden, kan het risico op aerogene besmetting van de medewerker met gg-EEEV, -WEEV of -VEEV tijdens voorgenomen werkzaamheden met replicatiecompetente virusdeeltjes niet uitgesloten worden. De COGEM adviseert voor werkzaamheden met gg-EEEV, -WEEV en -VEEV op ML-

III inperkingsniveau de volgende aanvullende maatregelen te hanteren om vorming van aerosolen en aerogene besmetting te voorkomen:

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd te worden;
- Het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding is verplicht.

4.3 Inschaling van werkzaamheden met gg-SPDV

De COGEM is van mening dat het voldoende aannemelijk is dat SPDV een verwaarloosbaar klein risico vormt voor de mens. SPDV kan echter alvleesklierziekte bij zalm veroorzaken. Op dit moment is er nauwelijks zalm in Nederlandse rivieren aanwezig. Zalm kwam in het begin van de vorige eeuw als trekzalm voor in Nederland, omdat zalm vanuit de zee naar paaigebieden in Duitsland en België trokken. Sinds de laatste vijftien jaar vinden initiatieven plaats voor herstel van het Rijn- en Maasstroomgebied, mede met het doel om verdwenen diersoorten zoals de zalm terug te laten keren.³¹

Bij werkzaamheden met gg-SPDV moet voorkomen worden dat SPDV in het milieu terecht komt. Dit kan gebeuren door inactivatie van geïnfecteerde eukaryote en animale cellen en het bijbehorende groeimedium. De aanvrager geeft aan dat ML-II inrichtingseisen en werkvoorschriften hiervoor garant zullen staan. Al het afval zal binnen het laboratorium in een veiligheidskabinet klasse 2 geïnactiveerd worden, daarna geautoclaveerd en vervolgens verbrand. De COGEM is van mening dat hiermee de kans op introductie van gg-SPDV in het milieu verwaarloosbaar klein geacht kan worden.

Voor kloneringswerkzaamheden en transfectie en handelingen met animale cellen adviseert de COGEM inschaling zoals beschreven in paragraaf 4.1 bij werkzaamheden met gg-ONNV en gg-RRV. De daarin genoemde aanvullende voorschriften zijn voor de voorgestelde werkzaamheden met dit dierpathogeen niet nodig.

5. Conclusie

Op basis van de kenmerken van de verschillende alphavirussen en de overwegingen beschreven in dit advies, adviseert de COGEM *O'nyong-nyong virus* en *Ross River virus* in te schalen in pathogeniteitsklasse 2. *Salmon pancreas disease virus* is een dierpathogeen en is eerder ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM ziet geen aanleiding deze classificatie te herzien.

Het *Venezuelan equine encephalitis virus* is een klasse 3 pathogeen. Voor de nauw verwante virussen *Eastern equine encephalitis virus* en *gg-Western equine encephalitis virus* adviseert de COGEM pathogeniteitsklasse 3 aan te houden.

De COGEM kan instemmen met de voorgestelde inperkingsniveaus en aanvullende voorschriften voor kloneringswerkzaamheden en handelingen met getransfecteerde animale cellen met *gg-O'nyong-nyong virus*, *gg-Ross River virus*, *gg-Salmon pancreas disease virus*, *gg-Venezuelan equine encephalitis virus*, *gg-Eastern equine encephalitis virus* en *gg-Western equine encephalitis virus*. 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 deze gg-virussen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Weaver SC *et al.* (2000). *Family Togaviridae*. In: Virus taxonomy, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Fauquet CM *et al.* Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 999-1008
2. Griffin DE (2001). Alphaviruses. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 917-962
3. Schlesinger S & Schlesinger MJ (2001). *Togaviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 895-916
4. Laine M *et al.* (2004) Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease. *Journal of Internal Medicine* 256: 457-471
5. Williams MC & Woodall JP (1965). O'nyong-nyong fever: An epidemic virus disease in East Africa: Virus isolations from man and serological studies up to July 1961. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59: 186-197
6. Lanciotti RS *et al.* (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology* 252: 258-268
7. Brault AC *et al.* (2004) Infection patterns of O'nyong-nyong virus in the malaria-transmitting mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 13: 625-635
8. Reusken CBEM (2006). Vectoren van het West-Nile virus in Nederland. *Infectieziekten Bulletin* 17:420-421
9. Public Health Agency of Canada – Material Safety Data Sheets for Infectious Substances. (9 september 2010). www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/
10. Rulli NE *et al.* (2007). The molecular and cellular aspects of arthritis due to Alphavirus infections – Lesson learned from Ross River Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1102: 96-108
11. Fraser JR (1986) Epidemic polyarthritis and Ross River virus disease. *Clin. Rheum. Dis.* 12: 369-388
12. Jones A *et al.* (2010). Molecular evolutionary dynamics of Ross River virus and implications for vaccine efficacy. *Journal of General Virology* 91:182-188
13. Zacks MA & Paessler S (2010). Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology* 140: 281-286
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. US department of Health and Human Services publication (CDC). No. 21-1112. December 2009.
15. Centers for Disease Control and Prevention – Information on Arboviral Encephalitides (25 oktober 2010). www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arbdet.htm
16. McLoughlin MF & Graham DA (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *Journal of Fish Diseases* 30: 511-531
17. Boucher P (1995). PhD thesis, Université de Rennes, Rennes, France
18. Graham DA *et al.* (2007). Biophysical properties of salmonid alphaviruses (SAV) - influence of temperature and pH on virus survival. *Journal of Fish Diseases* 30: 533-544
19. COGEM (2003). Combinatie vaccines voor HIV-1. (CGM/030604-02)
20. COGEM (2004). Constructie en productie van alphavirusvectoren. (CGM/040212-02)

21. COGEM (2006). Vaccinatie van apen met recombinante chimere alphavirusvectoren ten behoeve van vaccinonderzoek. (CGM/060314-01)
22. COGEM (2007). *Semliki forest virus* vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. (CGM/070723-02)
23. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met op het VEE virus gebaseerde replicondeeltjes (CGM/090603-01)
24. COGEM (2010). Classificatie van het Chikungunya virus. (CGM/100304-08)
25. COGEM (1998). Advies kennisgeving GGO 98-084. (CGM/981008-04)
26. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2008)
27. Vergunningverlening ggo's: Lijst van pathogene micro-organismen en agentia. (22 oktober 2010). <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/lijst%20van%20pathogene%20microorganismen%20en%20agentia%20BGGO%20niet-cursief%20080909.pdf>
28. Kistner O *et al.* (2007). The preclinical testing of a formaldehyde inactivated Ross River virus vaccine designed for use in humans. *Vaccine* 25: 4845-4852
29. Pfeffer M & Dobler G (2010). Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors* 3:35
30. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. (CGM/060420-04)
31. De Laak GAJ (2007). Kennisdocument Atlantische zalm. Sportvisserij Nederland, kennisdocument 6.