

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 4 februari 2016
KENMERK CGM/160204-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met deletiemutant van *Chikungunya virus*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 15-370_2.8-000 over werkzaamheden met een deletiemutant van het *Chikungunya virus* deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:


De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een deletiemutant van het *Chikungunya virus* (CHIKV). CHIKV veroorzaakt bij de mens een ernstige ziekte, maar is niet levensbedreigend. Overdracht van het virus vindt plaats via bepaalde exotische steekmuggen die van nature niet in Nederland aanwezig zijn. CHIKV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. De aanvrager verzoekt om omlaagschaling van kweekwerkzaamheden met de mutant van ML-III naar ML-II inperkingsniveau.

In de deletiemutant is een deel van één van de niet-structurele eiwitten verwijderd.

Op basis van de resultaten van *in vitro* experimenten en infectie-studies in muizen en makaken, acht de COGEM de deletiemutant verzwakt en verminderd ziekteverwekkend.

Zij is van mening dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-II niveau uitgevoerd kunnen worden, mits een aantal aanvullende voorschriften in acht worden genomen.

Onder navolging van deze voorschriften, acht zij de risico's voor mens en milieu bij werkzaamheden met de deletiemutant op ML-II inperkingsniveau verwaarloosbaar klein.



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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling van werkzaamheden met een deletiemutant van het *Chikungunya virus*

COGEM advies CGM/160204-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een deletiemutant van het *Chikungunya virus* (CHIKV). De vergunningsaanvraag is ingediend door de firma HALIX B.V. uit Leiden. Het CHIKV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹ De aanvrager verzoekt om omlaagschaling van de werkzaamheden van ML-III naar ML-II inperkingsniveau.

2. CHIKV

CHIKV behoort tot het genus *Alphavirus*, familie *Togaviridae*, en is een positief enkelstrengs RNA-virus.² Het genoom van het CHIKV is ongeveer 11,8 kb groot en is ingepakt in een icosahedrische eiwitmantel.^{2,3,4} Deze mantel wordt omgeven door een lipidemembraan. Het genoom codeert voor negen eiwitten, waarvan vier niet-structurele en vijf structurele eiwitten.^{2,4} Daarnaast bezit het genoom een zogenaamd ‘packaging’ signaal dat noodzakelijk is om het genomisch RNA in de eiwitmantel in te pakken.⁵

De niet-structurele eiwitten nsP1 tot en met nsP4 worden gecodeerd door het 5'-uiteinde van het genoom en zijn onder meer betrokken bij de replicatie van het virus.^{2,4} Het resterende deel van het genoom, aan het 3'-uiteinde, codeert voor de vijf structurele eiwitten.^{2,4} Dit zijn het manteleiwit (C of CP), twee glycoproteïnes (E1 en E2) en twee kleinere peptides (6K en E3). De glycoproteïnes E1 en E2 vormen een heterodimeer, worden ingebouwd in het lipidenmembraan en zijn betrokken bij de aanhechting en infectie van de gastheer cel.

2.1 Pathogeniteit en verspreidingsgebied

CHIKV veroorzaakt bij de mens een ernstige ziekte (chikungunya), maar is niet levensbedreigend. Symptomen zijn onder meer hoge koorts, gewrichtspijn, huiduitslag en ooginfecties.^{4,6} Na enkele weken verdwijnt de infectie meestal, maar er zijn patiënten die maanden of zelfs jaren last ondervinden van hun gewrichten.⁴ Er is geen specifieke antivirale behandeling tegen een infectie met CHIKV. Behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding. Ook is er geen vaccin tegen het virus beschikbaar. Wel zijn er verschillende kandidaatvaccins in ontwikkeling, en zijn er vaccins getest in klinische studies.⁷

CHIKV komt verspreid over de wereld voor in landen rondom de Indische Oceaan, Zuidoost Azië, Afrika, de Cariben, Noord- en Zuid-Amerika, en Zuid-Europa.⁸

2.2 Transmissie van CHIKV

Overdracht van CHIKV vindt plaats via steekmuggen. De Gele koortsmug (*Aedes aegypti*) is de primaire vector van CHIKV, maar andere *Aedes* muggen zoals de Aziatische tijgermug (*Aedes albopictus*), en enkele andere muggensoorten (*Opifex fuscus*, *Eretmapodites chrysogaster*) kunnen CHIKV overdragen.^{4,9,10,11,12} *O. fuscus* en *E. chrysogaster* komen niet in Nederland voor. Er zijn

in Nederland wel verschillende inheemse muggen die tot het *Aedes* geslacht behoren.¹³ Van sommige van deze muggensoorten (*Ae. caspius*, *Ae. detritus*, *Ae. vexans*) is aangetoond dat zij met CHIKV geïnfecteerd kunnen worden.¹¹ Het is niet bekend of zij het virus ook kunnen overdragen.

De Gele koortsmug kan zich in Nederland niet handhaven, maar wordt net als de Aziatische tijgermug incidenteel geïmporteerd in Nederland.^{14,15,16} De Aziatische tijgermug is waarschijnlijk wel in staat om de Nederlandse winters te overleven.¹⁷ In Nederland wordt de aanwezigheid van exotische muggen zoals de Gele koortsmug en de Aziatische tijgermug gemonitord en indien waargenomen, bestreden.¹⁸

Bij grote hoeveelheden van het virus (grootschalige productie, celkweek) kan aerogene transmissie van CHIKV niet worden uitgesloten.⁹ Er is verschillende malen melding gemaakt van laboratoriuminfecties veroorzaakt door CHIKV.¹⁹

2.3 Reservoir en gastheerbereik

Naast de mens en mug, zijn non-humane primaten, knaagdieren, vleermuizen en vogels gastheer en reservoir van CHIKV.^{4,9}

4. Deletiemutant $\Delta 5nsP3$

In de deletiemutant, genaamd $\Delta 5nsP3$, zijn in de coderende sequentie voor het nsP3 eiwit aan het hypervariabele deel van de C-terminus van wild-type (wt) CHIKV, 163 nucleotiden verwijderd. Dit heeft geresulteerd in een deletie van 61 aminozuren welke zijn vervangen door een 'linker' van 7 aminozuren.²⁰

Het nsP3 is een fosfoproteïne. De exacte functie van het nsP3 van CHIKV is nog niet bekend.^{4,21} Er wordt verondersteld dat het eiwit, zoals bij andere alphavirussen, onder meer betrokken is bij de virus-replicatie.⁴ Het hypervariabele deel aan de C-terminus speelt mogelijk een rol bij de pathogeniteit van het virus, en heeft mogelijk een modulerende functie bij de vorming van de 'stress-granules' op het moment dat de cel stress ondervindt.^{20,21}

In vitro studies met $\Delta 5nsP3$ (plaque assay, virustitratie en seriële cel passage) hebben laten zien dat de deletiemutant onder meer een verminderde replicatie vertoont ten opzichte van wild-type CHIKV en genetisch stabiel is.²⁰ Een *in vivo* studie in een muizenmodel heeft laten zien dat $\Delta 5nsP3$ geattenuëerd en verminderd pathogeen is ten opzichte van wild-type CHIKV.²⁰ Daarnaast heeft deze studie laten zien dat $\Delta 5nsP3$ immunogeen is en bescherming biedt tegen infectie met CHIKV.

5. Voorgenomen werkzaamheden

Constructie van het $\Delta 5nsP3$ virus en klinische vaccinatiestudies vormen géén onderdeel van voorliggende vergunningsaanvraag. Het elders geconstrueerde $\Delta 5nsP3$ zal als compleet virus bij de aanvrager worden aangeleverd. De werkzaamheden betreffen het in 'rollerbottles' opgroeien van

$\Delta 5nsP3$ op Vero-cellen. De maximale batchgrootte zal 20 liter bedragen. Vervolgens zullen de batches in kleinere hoeveelheden ten behoeve van klinische vaccinatiestudies uitgevuld worden.

6. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2010 geadviseerd om CHIKV in te delen in pathogeniteitsklasse 3, en om *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) CHIKV in combinatie met animale cellen en weefsels op ML-III niveau in te schalen.²² De genetische modificatie bestond uit de introductie van een gen coderend voor het 'green fluorescent protein' in het genoom van replicatiecompetent volvirulent CHIKV.

7. Overwegingen en advies

7.1 Pathogeniteit en attenuatie deletiemutant $\Delta 5nsP3$

De aanvrager stelt dat $\Delta 5nsP3$ geattenuëerd is, onder meer omdat de binding aan gastheercellen minder effectief is. Volgens de aanvrager wordt de replicatie van het virus hierdoor vertraagd. Hij verwijst hiervoor naar *in vitro* experimenten en naar experimenten met muizen. In deze studies worden $\Delta 5nsP3$ en volvirulent wild-type CHIKV met elkaar vergeleken.²⁰ De experimenten laten zien dat $\Delta 5nsP3$ in cellen kleinere plaques vormt dan wild-type CHIKV.

Tevens concludeert de aanvrager op basis van de muizenexperimenten dat $\Delta 5nsP3$ minder pathogeen is dan CHIKV, omdat de typerende ziektekenmerken verminderd aanwezig zijn. De verminderde pathogeniteit onderbouwt hij verder aan de hand van gegevens van *in vivo* veiligheidsstudies bij niet-humane aapachtigen (makaken). De aanvrager stelt dat, op basis van eerdere vaccinatiestudies met CHIKV in mens en dier, de resultaten uit de proeven met muizen en makaken naar de mens geëxtrapoleerd kunnen worden.^{23,24,25}

De COGEM wijst er op dat nsP3 mogelijk betrokken is bij de replicatie van het virus, maar niet bij de binding of hechting aan cellen. Zij is van mening dat de publicatie van Hallengård *et al.*²⁰ niet aantoont dat de binding van deletiemutant $\Delta 5nsP3$ aan gastheercellen minder effectief is.

Wel is zij op basis van de publicatie Hallengård *et al.* van mening dat $\Delta 5nsP3$ *in vitro* geattenuëerd is. Ook acht zij op grond van deze publicatie en op grond van de aangeleverde gegevens uit de veiligheidsstudie in makaken, aangetoond dat $\Delta 5nsP3$ voor muizen en makaken geattenuëerd is. De *in vivo* attenuatie blijkt onder meer uit een verlaging van virustiters in bloed met een factor van maximaal 10.000 ten opzichte van wild-type CHIKV. De COGEM merkt op dat deze reductie in virustiters de transmissie-efficiëntie van het virus via muggen kan verlagen.

Op basis van de experimenten in muizen en makaken beschouwt de COGEM $\Delta 5nsP3$ verminderd pathogeen. Zij onderschrijft de argumentatie van de aanvrager dat de verkregen gegevens geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens. Gezien de grootte van de aangebrachte deletie, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er reversie van $\Delta 5nsP3$ naar volvirulent CHIKV kan optreden.

7.2 Inschaling werkzaamheden

Gezien de attenuatie en verminderde pathogeniteit van $\Delta 5nsP3$, en gezien de verwaarloosbaar kleine kans dat er reversie optreedt van $\Delta 5nsP3$ naar volvirulent CHIKV, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden.

Omdat de aanvrager met hoge concentraties virus gaat werken, kan de COGEM niet uitsluiten dat de medewerker mogelijk met $\Delta 5nsP3$ besmet wordt. Indien een medewerker onverhoopt besmet zou worden, acht de COGEM de kans zeer klein dat het virus zich in de populatie verspreidt. Zij kan dit echter niet uitsluiten. Sommige transmissievectoren van het virus worden incidenteel in Nederland waargenomen. Daarnaast zijn er in Nederland muggensoorten aanwezig die met CHIKV geïnfecteerd kunnen worden, maar waarvan het onduidelijk is of ze het virus kunnen overdragen.

Ten einde uit te sluiten dat er aerogene transmissie van het virus kan optreden en een medewerker daardoor besmet wordt, adviseert de COGEM om open handelingen met $\Delta 5nsP3$ in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) uit te voeren. Daarnaast adviseert zij om tijdens de werkzaamheden handschoenen te dragen ten einde besmetting via wondjes aan de handen met $\Delta 5nsP3$ te voorkomen. Tevens adviseert de COGEM handelingen met 'sharps' (naalden, scalpels) te voorkomen. Indien hier niet aan ontkomen kan worden, adviseert zij om hierbij kevlarhandschoenen te gebruiken.

Tenslotte doet de COGEM de aanbeveling om bij werkzaamheden buiten het VK-II kabinet, waarbij sprake is van grote kweekvolumina $\Delta 5nsP3$, een beschermende bril en een daarvoor geëigend mond-neuskapje te dragen. Op deze manier wordt besmetting van de medewerker bij bijvoorbeeld een calamiteit met aerosolen met grote hoeveelheden virus (zoals een breukincident met een 'roller bottle'), voorkomen.

8. Conclusie

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden met deletiemutant $\Delta 5nsP3$ verwaarloosbaar klein indien deze op ML-II inperkingsniveau worden uitgevoerd. Zij adviseert daarbij de volgende aanvullende voorschriften in acht te nemen:

- open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet,
- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen,
- het gebruik van 'sharps' wordt tot een minimum beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen.

Tevens doet de COGEM de aanbeveling om bij handelingen met grote kweekvolumina van $\Delta 5nsP3$ buiten het VK-II kabinet, een mond-neuskapje en een beschermende bril te dragen.

9. Aanvullende opmerking

Uit de studies blijkt dat de virus titers van $\Delta 5nsP3$ in muizen en makaken verlaagd zijn ten opzichte van wild-type CHIKV. De COGEM wijst erop dat er geen gegevens over *in vivo* experimenten in muggen zijn aangeleverd. Hierdoor kunnen er geen conclusies getrokken worden over een eventuele attenuatie van $\Delta 5nsP3$ in muggen. Indien de deletiemutant in muggen niet geattenuëerd is, zal deze

zich hierin goed kunnen vermenigvuldigen, waardoor de ‘fitness loss’ van de mutant gedeeltelijk zal worden opgeheven. De COGEM wijst er daarom op dat het bij eventuele toekomstige toepassingen van $\Delta 5nsP3$ in klinische studies of markttoelatingen, voor de milieurisicobeoordeling van belang is dat gegevens over de attenuatie van $\Delta 5nsP3$ in muggen worden aangeleverd.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/Bijlage4/geldigheidsdatum_26-01-2016
2. Powers A *et al.* (2012). Family Togaviridae. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Kahn AH *et al.* (2002). Complete nucleotide sequence of *Chikungunya virus* and evidence for an internal polyadenylation site. J. Gen. Virol. 83: 3075-3084
4. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields virology, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
5. Kim DY *et al.* (2011). Conservation of a packaging signal and the viral genome RNA packaging mechanism in *Aphavirus* evolution. J. Virol. 85: 8022-8036
6. Mahendradas P *et al.* (2013). Chikungunya and the eye: a review. J. Ophthalmic Inflamm. Infect. 3: 35-44
7. Ahola T *et al.* (2015). Therapeutics and vaccines against *Chikungunya virus*. Vector-borne and zoonotic diseases 15: 250-257
8. Centers of Disease Control (2015). Geographic distribution of *Chikungunya virus*.
www.cdc.gov/chikungunya/geo/ (bezoekt 26 januari 2016)
9. Public Health Agency of Canada (2010). *Chikungunya virus* pathogen safety data sheet – infectious substances. www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/chikungunya-eng.php (bezoekt 26 januari 2016)
10. Pialoux G *et al.* (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. Lancet Infect. Dis. 7: 319-327
11. Coffey LL *et al.* (2014). *Chikungunya virus*-vector interactions. Viruses 6: 4628-4663
12. Cavrini F *et al.* (2009). Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. J. Infect. Dev. Ctries. 3: 744-752
13. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Aedes*.
www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/search/nsr_search.php?search=Aedes (bezoekt: 1 februari 2016)
14. Brown JE *et al.* (2011). *Aedes aegypti* mosquitoes imported into the Netherlands, 2010. Emerg. Infect. Dis. 17: 2335-2337
15. Beeuwkes J *et al.* (2011). Surveillance and findings of exotic mosquitoes in used tires in The Netherlands: a methodological approach. Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet. 22: 31-37
16. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (2011). Monitoring vectoren.
17. Takumi K *et al.* (2009). Introduction, scenarios for establishment and seasonal activity of *Aedes albopictus* in the Netherlands. Vector Borne Zoonotic Dis. 9: 191-196

18. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. (2014). Draaiboek bestrijding exotische muggen ‘Vondst exotische mug: wat nu?’ www.nvwa.nl/onderwerpen/eten-drinken-roken/dossier/vectoren/draaiboek-bestrijding-exotische-muggen (bezocht: 1 februari 2016)
19. Centers of Disease Control (2015). In: CDC Health Information for International Travel, Chapter 3, Chikungunya. www.nc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya (bezocht: 4 februari 2016)
20. Hallengård D *et al.* (2014). Novel attenuated chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. *J. of Virol.* 88: 2858-2866
21. Fros JJ *et al.* (2012). *Chikungunya virus* nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J. of Virol.* 86: 10873–10879
22. COGEM (2010). Classificatie van het *Chikungunya virus*. Advies CGM/100404-08
23. Parola P *et al.* (2006). Novel *Chikungunya virus* variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1493-1499
24. Gardner J *et al.* (2010). *Chikungunya Virus* arthritis in adult wild-type mice. *J. Virol.* 84: 8021–8032
25. Morrison TE *et al.* (2011). A mouse model of *Chikungunya virus*-induced musculoskeletal inflammatory disease. *American J. Pathol.* 178: 32-40