

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 25 juli 2019  
**KENMERK** CGM/190725-02  
**ONDERWERP** Advies omlaagschaling werkzaamheden met SRIPs afgeleid van TBEV

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Werkzaamheden met 'single round infectious Flavivirus-particles' (IG 19-200\_2.8-000), ingediend door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met 'Single-Round Infectious Particles' (SRIPs) afgeleid van het *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV). TBEV is een flavivirus en kan via een tekenbeet overgedragen worden op de mens. De aanvrager is voornemens SRIPs te produceren die voorzien zijn van oppervlakte-eiwitten van andere (door muggen overdraagbare) flavivirussen. Daarnaast wil de aanvrager met deze SRIPs serumneutralisatie testen ontwikkelen en valideren.

De aanvrager verzoekt om de voorgenomen werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau II.

SRIPs kunnen cellen éénmalig infecteren, maar geen nieuwe infectieuze virusdeeltjes vormen. Het serum dat gebruikt wordt in de neutralisatietest ondergaat een hittebehandeling om eventueel aanwezige flavivirussen te inactiveren. Ook is de sequentie-overeenkomst tussen de plasmiden gebruikt voor de productie van de SRIPs beperkt. De COGEM is van oordeel dat de kans dat door recombinatie replicatiecompetent virus ontstaat tijdens de productie van de SRIPs en tijdens de serumneutralisatietesten verwaarloosbaar klein is.

Op basis van de bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de omlaagschaling van de werkzaamheden met van TBEV afgeleide SRIPs van ML-III naar ML-II niveau toe te staan. Onder inachtneming van dit inperkingsniveau (ML-II), acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen handelingen 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  
Vorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo  
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

# Omlaagschaling van werkzaamheden met van *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) afgeleide ‘Single Round Infectious Particles’

## COGEM advies CGM/190725-02

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor de omlaagschaling van werkzaamheden met van *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) afgeleide ‘Single Round Infectious Particles’ (SRIPs), ingediend door het RIVM (IG 19-200). De aanvrager is voornemens in deze SRIPs de structurele genen van TBEV te vervangen door een luciferase gen, en de SRIPs *in trans* te voorzien van de antigenen (prM en E) van verschillende flavivirussoorten (*Zika virus* (ZIKV), *Dengue virus* serotypen 1-4 (DENV1-4), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Usutu virus* (USUV), *Yellow fever virus* (YFV) en TBEV) en het capsid eiwit van TBEV. De geproduceerde SRIPs zullen worden gebruikt om virus-neutralisatie testen te ontwikkelen en te valideren. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

### 2. Flavivirussen

TBEV behoort tot de familie *Flaviviridae* en het genus *Flavivirus*.<sup>1</sup> Flavivirussen zijn arbovirussen en kunnen via muggen en andere bloedzuigende geleedpotigen (o.a. teken) worden overgedragen. Het genus *Flavivirus* bevat soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij mens of dier. De soorten met de grootste wereldwijde gezondheidsimplicaties voor de mens zijn WNV, YFV, JEV, DENV, ZIKV en TBEV.<sup>2</sup> WNV, YFV, JEV, DENV, ZIKV en USUV worden via muggen overgedragen naar de mens. TBEV wordt door teken naar de mens overgedragen. Infecties met flavivirussen verlopen veelal asymptomatisch, maar in sommige gevallen kan infectie resulteren in zeer ernstige gezondheidsproblemen en sterfte. TBEV, JEV, WNV en ZIKV kunnen bij mensen (of in het geval van ZIKV bij het ongeboren kind) neurologische problemen veroorzaken, zoals meningitis of encephalitis. YFV en DENV kunnen hemorrhagische koorts veroorzaken.<sup>3,4</sup> USUV veroorzaakt voornamelijk sterfte onder vogels (merels). Indien mensen met een onderliggend ziektebeeld geïnfecteerd worden kunnen in zeldzame gevallen neurologische aandoeningen ontstaan.<sup>5</sup>

Flavivirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kb.<sup>6</sup> Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne.<sup>7</sup> Door splitsing van het polyproteïne worden drie structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd. Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn oppervlakte-eiwitten die betrokken zijn bij de binding van het virus aan een cel. De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA replicatie en de verwerking van het polyproteïne.<sup>8</sup>

### 3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft verschillende soorten behorende tot het genus *Flavivirus* geïdentificeerd.<sup>9</sup> DENV, JEV, TBEV, WNV, YFV, en ZIKV zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. *Yokose virus* is als strikt

dierpathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Het *Modoc virus*<sup>10</sup> en USUV<sup>5</sup> zijn in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld. De YFV vaccinstam 'YF-17D' is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Recent heeft de COGEM de groep 'classical insect-specific flaviviruses'<sup>11</sup> (cISF, (nog) niet erkend door de ICTV) generiek als strikt dierpathogenen in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.<sup>12</sup>

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met TBEV, maar wel over werkzaamheden met andere flavivirussen, zoals gg-JEV<sup>13</sup>, en gg-ZIKV<sup>14</sup>, en met gg-WNV<sup>15</sup>, gg-ZIKV<sup>16</sup> en gg-YFV<sup>16</sup> in associatie met muggen. In de onderhavige aanvraag worden geen werkzaamheden met muggen uitgevoerd.

Bij werkzaamheden met een JEV vaccinstam (SA<sub>14-14-2</sub><sup>MCV</sup>) heeft de COGEM ingestemd met een omlaagschaling naar ML-II inperkingsniveau.<sup>13</sup>

Bij werkzaamheden betreffende de productie van gg-ZIKV replicons heeft de COGEM geadviseerd de werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau, waarbij de COGEM instemde met het aanvullende voorschrift dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van ZIKV en andere verwante virussen. Productie van en infectie met gg-ZIKV waarbij autonoom replicerende gg-ZIKV deeltjes kunnen ontstaan, of werkzaamheden met chimeer ZIKV-YFV virus waarbij de coderende sequenties voor de prM en E eiwitten zijn vervangen door de overeenkomstige sequenties van YFV vaccinstam YF-17D, heeft zij beide ingeschaald op ML-III niveau, omdat bij onbedoelde infectie (bijvoorbeeld snij- of prikincidenten), het virus via seksuele transmissie overgedragen kan worden. Hierbij werd geadviseerd dat het gebruik van 'sharps' tot een minimum moet worden beperkt en alleen toegestaan is onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (door bijvoorbeeld het gebruik van kevlarhandschoenen).<sup>14</sup>

#### **4. Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens onderzoek te verrichten met SRIPS afgeleid van TBEV. Hiervoor worden eerst de verschillende SRIPs geproduceerd. Vervolgens zullen de SRIPs gebruikt worden om virus-neutralisatietesten te ontwikkelen en valideren, waarmee de aanwezigheid van *Flavivirus*-specifieke neutraliserende antistoffen kunnen worden gedetecteerd.

##### **4.1 Productie van de SRIPs**

Voor de productie van de SRIPs worden replicons van TBEV gebruikt, waarbij de structurele eiwitten (C, (pr)M en E) verwijderd zijn uit het TBEV genoom. Door de structurele eiwitten *in trans* aan te bieden worden de replicons ingepakt en ontstaan SRIPs die slechts één keer kunnen infecteren.<sup>7</sup> Deze SRIPs zullen de repliconsequentie van TBEV bevatten (i.e., de 5' en 3' UTR en de coderende sequenties van de niet-structurele eiwitten), en een luciferase-sequentie ter vervanging van de coderende sequenties van de prM en E eiwitten. Daarnaast zullen de deeltjes het C eiwit van TBEV en de (pr)M en E eiwitten van één flavivirussoort bevatten. Er worden dus verschillende SRIP-deeltjes geproduceerd die elk gepseudotypeerd zijn met een ander *Flavivirus* (pr)M en E eiwit.

De productie van de SRIPs zal plaatsvinden in HEK293 cellen. Hierin vindt co-transfectie plaats van drie plasmiden, i.e., de repliconplasmide (pcD3TSrep), capsidplasmide (pcD3TSC) en de

prMembraan- en Envelopplasmide (pcD3TSprME, waarbij een apart plasmide gebruikt wordt voor elk van de verschillende flavivirussen). De C en verschillende prME plasmiden bevatten geen TBEV 5'- en 3'-UTR sequenties.

De C plasmide en de prME plasmiden van TBEV en USUV zijn geoptimaliseerd voor expressie in humane cellijnen. De aanvrager stelt dat er sequentieovereenkomst is tussen de verschillende plasmiden, maar dat deze beperkt is. De COGEM merkt op dat er enkele inconsistenties zitten in de mate van overlap zoals vermeld op het aanvraagformulier en in bijgevoegde bijlagen. Nadere analyse bevestigt dat tussen de repliconplasmide en de capsidplasmide, en tussen de repliconplasmide en de prME plasmiden beperkte sequentieoverlap is. Er is geen sequentieovereenkomst tussen de prME plasmide en de C plasmide.

#### **4.2 Ontwikkeling en validatie virus-neutralisatie test**

De SRIPs zullen voor humaan en/of animale serumneutralisatietesten worden gebruikt. Een eerste stap in dit proces is incubatie van humaan en animaal serum bij 56°C voor 30 minuten om eventueel aanwezige flavivirussen (en complement) te inactiveren.<sup>17,18,19</sup> In de tweede stap worden de SRIPs toegevoegd aan het serum en geïncubeerd. Als derde stap wordt het SRIP-serum incubatiemengsel toegevoegd aan een Vero-celcultuur. De aan- of afwezigheid van neutraliserende antilichamen in het serum zal invloed hebben op de mogelijkheid tot infectie van de SRIPs in de Vero cellen en daarmee de luciferase expressie.

#### **4.3 Voorgenomen werkvoorschriften**

De uitvoerder wil alle werkzaamheden uitvoeren in een ML-II laboratorium. De werkvoorschriften die hierbij door de aanvrager worden voorgesteld en gehanteerd zijn:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een VKII-kabinet uitgevoerd;
- Humaan en animaal serum ondergaat een hittestap voor inactivatie van eventuele flavivirussen;
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan werkzaamheden.

### **5. Overweging**

Omdat de flavivirussen ingedeeld zijn in pathogeniteitsklasse 3 (met uitzondering van USUV), dienen de werkzaamheden volgens de Regeling ggo<sup>20</sup> in principe plaats te vinden op inperkingsniveau ML-III. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren, en heeft hiervoor een risicoanalyse aangeleverd. Een belangrijk aspect bij de milieurisicobeoordeling is de kans op vorming van replicatiecompetent virus (RCV). De aanvrager zal niet testen op RCV.

#### **5.1 Attenuatie TBEV-afgeleide SRIPs**

De SRIPs die de aanvrager voornemens is te genereren zijn gebaseerd op TBEV, maar door deletie van de structurele genen (de structurele eiwitten worden *in trans* aangeboden), kunnen de ontstane SRIPs slechts één infectieronde doormaken. Verdere verspreiding van SRIPs is daarmee onmogelijk,

tenzij tijdens de productie of neutralisatie testen recombinatie plaats kan vinden waarbij de structurele genen weer opgenomen worden in het replicon RNA van de SRIP.

### **5.2 Kans op RCV-vorming tijdens de productie**

De aanvrager stelt dat de kans op RCV vorming tijdens de productie nihil is, aangezien er twee tot drie zeer specifieke recombinatiegebeurtenissen moeten plaatsvinden. Tussen de prME en C plasmiden zijn volgens de aanvrager geen homologe sequenties aanwezig, waardoor 'cross-over' niet mogelijk is. Daarnaast acht de aanvrager de kans op recombinatie tussen zowel de capsid en repliconplasmide en de prME en repliconplasmide erg klein omdat de mate van sequentieovereenkomsten onvoldoende is.

Eerder is gerapporteerd dat bij productiewerkzaamheden met 3 lineaire flavivirus DNA strengen die overlap vertonen en in cellen worden getransfecteerd, RCV kan ontstaan.<sup>21</sup> Elementen die hierbij een belangrijke rol spelen zijn de open uiteinden van de DNA strengen en de sequentieovereenkomst. De COGEM acht de kans op recombinatie bij het productiesysteem in de huidige aanvraag verwaarloosbaar klein, omdat aan beide voorwaarden niet wordt voldaan. Ten eerste betreft het in de onderhavige studie co-transfectie van 3 circulaire DNA plasmiden en daarnaast is de sequentieovereenkomst tussen de plasmiden gereduceerd, en zijn de nucleotide sequenties in enkele C en prME expressieplasmiden codon-geoptimaliseerd.

De COGEM acht de kans op RCV-vorming in de cel door recombinatie tussen replicon RNA en het mRNA coderend voor C en prME eveneens verwaarloosbaar klein, omdat daarvoor meerdere recombinatie 'events' nodig zijn en de sequentieovereenkomst beperkt is.

In een vergelijkbaar systeem voor de productie van SRIPs, waarbij een CprME expressiecassette stabiel geïntegreerd was in het genoom van 'baby hamster kidney' (BHK) cellen en het flavivirus replicon getransfecteerd werd als een RNA molecuul, is aangetoond dat na *in vitro* en *in vivo* passage geen RCV gevormd werd.<sup>22</sup>

### **5.3 Kans op RCV-vorming tijdens de neutralisatie testen met humaan/animaal serum**

De aanvrager stelt dat de kans op RCV vorming tijdens de neutralisatietest nihil is, aangezien flavivirusviremie in het algemeen kortdurend is en daarmee de kans op aanwezigheid van wildtype flavivirussen of flavivirusgenomen in (diagnostische) serummonsters – zelfs bij hoge infectiedruk – klein is. De COGEM merkt hierbij op dat USUV echter wel aangetroffen kan worden in sera van de bloedbank.<sup>23</sup> Daarnaast geeft de aanvrager aan dat door hitte-behandeling van de sera de kans op aanwezigheid van wildtype of geattenuerd (bijvoorbeeld bij vaccinatie) *Flavivirus* nihil is. Ook zijn er volgens de aanvrager in de literatuur geen aanwijzingen voor homologe of niet-homologe recombinatie tussen verschillende flavivirus-replicons, zelfs onder optimale laboratoriumcondities.

De COGEM is van oordeel dat ook bij infectiewerkzaamheden (neutralisatietest) de kans op het ontstaan van RCV verwaarloosbaar klein is, omdat door de hittebehandeling eventueel aanwezige wildtype flavivirussen geïnactiveerd worden, en omdat de kans dat flavivirus-replicon RNA

recombineert met ander RNA verwaarloosbaar klein is.<sup>24</sup> De COGEM acht een RCV test bij de productie- en infectiewerkzaamheden daarom ook niet noodzakelijk.

#### **5.4 Signalering betreffende de werkvoorschriften**

De COGEM signaleert dat SRIPs in staat zijn tot een 'single-round of infection'. Blootstelling van de laboratoriummedewerker dient voorkomen te worden, omdat de SRIPs wel in de cellen van een geïnfecteerde medewerker kunnen repliceren. Daarom acht de COGEM de door de aanvrager voorgestelde maatregelen vanuit ARBO-overwegingen raadzaam. Daarnaast signaleert de COGEM dat vanuit ARBO-overwegingen tijdens de werkzaamheden het gebruik van sharps tot een minimum beperkt dient te worden.

#### **6. Advies**

Op basis van de bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de omlaagschaling van de werkzaamheden met van TBEV afgeleide SRIPs van ML-III naar ML-II niveau toe te staan. Indien de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau (ML-II) worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

#### **Referenties**

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The online 10th Report of the ICTV> Genus: Flavivirus. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus) (bezocht: 16 juli 2019)
2. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
3. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2018). <https://www.rivm.nl/arbovirussen> (bezocht: 16 juli 2019)
4. Best SM (2016). Flaviviruses. *Curr. Biol.* 26: R1258-R1260
5. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van het *Usutu virus*. (CGM/180827-01)
6. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. Matsuda M *et al.* (2018). High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci. Rep.* 8: 16624
8. Simmonds P *et al.* (2012). Part II – The positive sense single stranded RNA viruses: Genus Flavivirus. In: *Virus Taxonomy*, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
9. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
10. COGEM (2015). Classificatie van *Elephantid herpesvirus* en *Modoc virus*. COGEM advies CGM/150902-01

11. Blitvich BJ & Firth AE (2015). Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* 7: 1927-1959
12. COGEM (2019). Generiek advise pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
13. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Japanese encephalitis virus*. COGEM advies CGM/151015-01
14. COGEM (2016). Classificatie van en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Zika virus*. COGEM advies CGM/160307-01
15. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus* en gg-*West Nile virus* in combinatie met muggen. COGEM advies CGM/150907-02
16. COGEM (2017). Inschaling van werkzaamheden met gg-*Zikavirus* en gg-*Yellow fever virus* in associatie met muggen. COGEM advies CGM/170720-01
17. Fang Y *et al.* (2009). Comparative thermostability of West Nile, St. Louis encephalitis, and western equine encephalomyelitis viruses during heat inactivation for serologic diagnostics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 862-863
18. Kreil TR *et al.* (2003). West Nile virus and the safety of plasma derivatives: verification of high safety margins, and the validity of predictions based on model virus data. *Transfusion.* 43: 1023-1028
19. World Health Organization. (2007). Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. World Health Organization.  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69687/who\\_ivb\\_07.07\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69687/who_ivb_07.07_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (bezoekt: 18 juli 2019)
20. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01> (bezoekt: 18 juli 2019)
21. Aubry F *et al.* (2014). Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J. Gen. Virol.* 95: 2462-2467
22. Harvey TJ *et al.* (2004). Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *J. Virol.* 78: 531-538
23. Zaaijer HL *et al.* (2019). Usutu virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion.* Doi: 10.1111/trf.15444. [Epub ahead of print]
24. Monath TP *et al.* (2005). Recombination and flavivirus vaccines: a commentary. *Vaccine.* 23: 2956-2958.