

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

DATUM 18 maart 2020
KENMERK CGM/200318-02
ONDERWERP Advies infectie van teken met *gg-Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijziging van het dossier IG 15-194_2.8-003 getiteld 'Genetisch gemodificeerde virussen (WNV, CHIKV) met 'loss of function' puntmutaties' van de Wageningen Universiteit deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

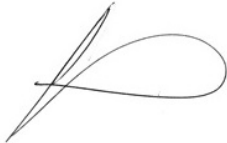
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling, veiligheidsvoorschriften en inperkingsmaatregelen van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) in teken. Hierbij zullen in het wild gevangen schapen-, egel- en hondenteken worden geïnfecteerd met gg-TBEV om de replicatie te kunnen bestuderen. De teken worden door middel van een bloedmaaltijd waarbij bloed vermengd is met virus, geïnfecteerd. Na incubatie zal het virus uit de geïnfecteerde teken geïsoleerd worden voor verdere analyses, door de teken te vermalen met een 'bullet blender'.

De COGEM stemt ermee in om werkzaamheden met gg-TBEV in teken op ML-III inperkingsniveau uit te voeren, indien de door de aanvrager voorgestelde additionele inperkingsmaatregelen en de door de COGEM geadviseerde aanvullende maatregelen gehanteerd worden om verspreiding van geïnfecteerde teken te voorkomen. Het betreft hier het afzetten bij de deur van de laboratoriumruimte met dubbelzijdig tape, het werken in een bak die aan de randen afgezet is met dubbelzijdig tape bij handelingen buiten de veiligheidskabinet, een controle op teken van de medewerker(s) in het onwaarschijnlijke geval van een ontsnapping en het toevoegen van zeep aan de waterbarrière tijdens de incubatie van geïnfecteerde teken.

Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van oordeel 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,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van prof. dr. J.W.R. Hovius, werkzaam bij Amsterdam Universitair Medische Centra (UMC).

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden prof. dr. J. Kortekaas en dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met teken geïnficeerd met gg-*Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)

COGEM advies CGM/200318-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling, veiligheidsvoorschriften en inperkingsmaatregelen van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) in teken (IG 15-194). Hierbij zullen in het wild gevangen teken worden geïnficeerd met gg-TBEV om de replicatie te kunnen bestuderen en te vergelijken met wildtype virussen. De teken worden door middel van een bloedmaaltijd waarbij bloed vermengd is met virus, geïnficeerd. Na incubatie zal het virus uit de geïnficeerde teken geïsoleerd worden voor verdere analyses door de teken te vermalen met een 'bullet blender'. De aanvrager wil deze werkzaamheden toevoegen aan een bestaande vergunning voor werkzaamheden onder ML-III.

1.1 *Tick-borne encephalitis virus*

TBEV behoort tot het genus *Flavivirus* van de familie *Flaviviridae*¹ en kan door besmette teken via een bloedmaaltijd naar de mens worden overgedragen. Er zijn drie belangrijke pathogene TBEV subtypes: European of Western tick-borne encephalitis virus (TBEV-Eu), Siberian tick-borne encephalitis virus (TBEV-Sib), en het Far eastern Tick-borne encephalitis virus (TBEV-FE; voorheen bekend als Russian spring summer encephalitis virus, RSSEV).² TBEV-Eu is het meest voorkomende TBEV subtype in West-Europa.

TBEV heeft een positief RNA genoom van ongeveer 11.000 nucleotides in lengte, wat codeert voor één 'open reading frame' (ORF). De 5' en 3' 'untranslated regions' (UTR's) zijn belangrijk voor RNA replicatie en de vertaling van het ORF naar een polyproteïne van ongeveer 3400 aminozuren. Klieving van het polyproteïne door cellulaire en viraal gecodeerde proteases leidt tot de vorming van drie structurele (C, prM (precursor M) en E) en zeven niet-structurele eiwitten, waaronder het RNA polymerase. C, prM en E maken onderdeel uit van het virusdeeltje, samen met het genomische RNA en een lipidemembraan; na klieving van prM door het cellulaire furin protease wordt het infectieuze virusdeeltje gevormd.³

Infectie met TBEV verloopt vaak asymptomatisch of subklinisch, echter in sommige gevallen kan infectie resulteren in zeer ernstige gezondheidsproblemen en sterfte. Infectie met TBEV-Eu of TBEV-Sib verloopt meestal in twee fases. In de eerste fase openbaart de ziekte zich met griepachtige verschijnselen als koorts, vermoeidheid, algehele malaise en hoofdpijn. Na een klachtenvrije periode volgt een tweede fase met koorts, en neurologische problemen als meningitis of encefalitis. Een deel van deze patiënten houdt langdurige restverschijnselen aan de infectie over en 1 tot 2% overlijdt. Er is geen behandeling van TBEV infectie beschikbaar; er is wel vaccinatie tegen TBEV mogelijk.^{4,9}

Hoewel meer dan 14 tekensoorten met TBEV geïnfecteerd kunnen worden, zijn *Ixodes ricinus* (TBEV-Eu) en *Ixodes persulcatus* (TBEV-Sib en TBEV-FE) de belangrijkste vectoren voor het virus.^{5,6,7} Naast infectie via teken, kunnen mensen in zeldzame gevallen ook door de consumptie van rauwe melk van geïnfecteerde dieren (geiten, schapen en koeien) besmet raken.⁸ Er zijn geen gevallen van overdracht van mens-op-mens bekend, met uitzondering van verticale overdracht (moeder op kind).^{8,9} Er zijn laboratoriumbesmettingen gerapporteerd na incidenten met naalden en door blootstelling aan aerosolen met virus.^{8,9}

TBEV is in Nederland aangetoond in teken op de Sallandse Heuvelrug en de Utrechtse Heuvelrug en sinds 2016 zijn er enkele patiënten geweest die de ziekte in Nederland hebben opgelopen.¹⁰

1.2 Teken

Teken (Ixodida) behoren tot de spinachtigen (Arachnida) en worden onderverdeeld in een aantal families, waaronder de Ixodidae (harde teken) en de Argasidae (zachte teken).¹¹ Teken zijn in de verschillende stadia van hun levenscyclus (van larve via nimf naar het adulte stadium) afhankelijk van een bloedmaal dat zij door middel van aanhechting en penetratie van de huid nuttigen bij hun gastheer.^{12,13} De primaire gastheer en reservoir van teken in het larvale stadium zijn kleine zoogdieren, zoals kleine knaagdieren. Vogels en grotere zoogdieren (waaronder mensen) dienen vaak als voedselbron (bloedmaaltijden) voor de volwassen teek.⁷ Teken kunnen verschillende pathogenen bij zich dragen en overbrengen (virussen, bacteriën en parasieten).¹⁴

2. Voorgenomen werkzaamheden

De teken zullen geïnfecteerd worden door middel van een bloedmaaltijd. In een zogenaamd tekenvoedingssysteem (een afgesloten container) nemen de teken via een artificieel membraan bloed op dat vermengd is met virus. Voor infectie worden gg-TBEV virussen van de Europese stammen Salland en Neudorfl gebruikt, waarbij TBEV-Neudorfl een puntmutatie in het 3' UTR bevat die volgens de aanvrager leidt tot attenuatie van het virus. Gg-TBEV-Salland bezit de wildtype sequentie, maar wordt als ggo bestempeld omdat het virus *in vitro* vanaf DNA wordt geproduceerd. De tekensoorten die gebruikt gaan worden, zijn uit het wild verkregen en betreffen schapenteken (*Ixodes ricinus*), egelteken (*Ixodes hexagonus*) en hondenteken (*Dermacentor reticulatus*). Na incubatie van de geïnfecteerde teken wordt het virus voor verdere analyse geïsoleerd door de teken in een 'bullet blender' te homogeniseren.

De hier beschreven handelingen zullen worden uitgevoerd in het ML-III-laboratorium. De aanvrager neemt diverse veiligheidsmaatregelen, onder meer om ontsnapping van geïnfecteerde teken te voorkomen:

- Open handelingen met gg-TBEV vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II (VK-II). Dit betreft handelingen met teken tijdens bloedmaaltijden en de analyses van het virus na het homogeniseren van de teken.
- Voorafgaand aan de plaatsing van teken in het tekenvoedingssysteem worden de teken geïmmobiliseerd door ze te koelen op ijs.
- Ontsnapping van (geïnfecteerde) teken wordt tegengegaan door het werkgebied ('tick-arena') te omringen met dubbelzijdig tape wat een fysieke barrière vormt. Dit geldt voor alle handelingen

- met teken, zowel op werkbanken als in de VK-II. Uit experimenten is volgens de aanvrager gebleken dat teken niet in staat zijn deze barrière van tape te doorkruisen.
- Na infectie worden de teken in gesloten reageerbuisjes geplaatst met een gaatje in het deksel (0,5 mm). De rekken met de buisjes met teken worden omringd door een laag water van 1 cm diep en worden in een doos geplaatst waarvan de randen zijn afgezet met dubbelzijdig tape. Het water vormt een fysieke barrière tegen de ontsnapping van teken, maar is ook nodig voor het creëren van de juiste luchtvochtigheid. Incubatie vindt plaats in een klimaatkast die zich in het ML-III laboratorium bevindt. Op eenzelfde manier zullen de tekenvoedingssystemen door water en dubbelzijdig tape omringd zijn. De tekenvoedingssystemen zijn afgesloten door middel van een plug.
 - Het aantal levende en dode teken wordt vóór en ná aanvang van het experiment geteld. De aanvrager verwacht dat eventueel ontsnapte teken die niet teruggevonden kunnen worden, na maximaal 48 uur uitgedroogd zijn.
 - Het overplaatsen naar een nieuw buisje van (geïnfecteerde) teken na vervellen, zal plaatsvinden op de werkbank buiten de VK-II. Bij deze handeling worden geen aerosolen gevormd.
 - Het homogeniseren van teken in de ‘bullet blender’ zal buiten de VK-II plaatsvinden. Vanwege het incidenteel geopend of beschadigd zijn van de reageerbuisjes, dragen de medewerkers mondkapjes (P2 of hogere specificatie) en handschoenen bij deze handeling. In geval van een incident met een geopend of beschadigd buisje, stelt de aanvrager dat de medewerker dient te handelen afhankelijk van de ernst van de besmetting of aerosolvorming. Het openen van de buisjes gebeurt in de VK-II.
 - Medewerkers dragen beschermende kleding (volgens werkvoorschriften 9.1.1.4.2.n van de Regeling ggo) en zijn gevaccineerd tegen TBE met FSME-IMMUN (Pfizer).

3. Eerder COGEM advies

TBEV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁵ In een recent advies over TBEV-replicons concludeerde de COGEM dat de kans op recombinatie met andere (flavi)virussen verwaarloosbaar klein is.¹⁶

4. Overweging en advies

Volgens bijlage 5, lid 5.6.3, van de Regeling ggo (handelingen met al dan niet genetisch gemodificeerde dieren in associatie met genetisch gemodificeerde organismen) zouden de beschreven werkzaamheden (infecties van teken met gg-TBEV) ingeschaald moeten worden op DM-III. De inrichtings- en werkvoorschriften van laboratoria en dierverblijven, zoals vastgelegd in de Regeling ggo, zijn niet toegesneden op het specifieke gebruik van kruipende of vliegende (tussen)gastheren dan wel vectoren, zoals teken. De werkruimte dient daarom aan speciale eisen te voldoen, bijvoorbeeld het aanleggen van gevalideerde fysieke barrières, ten einde verspreiding van gg-organismen naar het milieu te voorkomen.

4.1 Werkzaamheden met teken - algemeen

De aanvrager heeft de protocollen, behorende bij de handelingen met teken en infecties in teken, in een ML-III laboratorium overlegd. Tevens heeft de aanvrager literatuur overlegd, waarin de beschreven veiligheidsmaatregelen om tekenontsnapping tegen te gaan, zijn gevalideerd.

Tijdens de werkzaamheden met teken wordt het werkgebied ('tick-arena') met dubbelzijdig tape afgezet. Eveneens wordt het aantal teken voor en na elk experiment geteld, om ongemerkte ontsnapping van teken te voorkomen. De aanvrager geeft aan dat hij experimenteel heeft bevestigd dat teken niet in staat zijn gedurende twee uur de 'tick-arena' via het dubbelzijdige tape te verlaten. In geval een teek na ontsnapping niet kan worden teruggevonden, verwacht de aanvrager dat de teek binnen 48 uur zal uitdrogen.

De COGEM is van oordeel dat wanneer het werkgebied is afgezet met dubbelzijdig tape en wanneer het aantal teken voorafgaand en na afloop van elk experiment geteld worden, de kans op ongemerkte ontsnapping van (geïnfecteerde) teken verwaarloosbaar klein is. Aangezien teken een hoge luchtvochtigheid (80-90%) nodig hebben voor overleving, is de verwachting dat eventueel ontsnapte teken binnen 48 uur zullen uitdrogen onder normale laboratoriumcondities.

Met het oog op onvoorziene incidenten adviseert de COGEM als aanvullende maatregel om op de vloer bij de deuropeningen van de laboratoriumruimte dubbelzijdig tape aan te brengen, zodat een ontsnapte en niet teruggevonden geïnfecteerde teek niet in staat is de laboratoriumruimte te verlaten. Het tape moet regelmatig vervangen worden. Verder merkt de COGEM op dat, in geval van ontsnapping van een teek, de medewerker(s) bij verlaten van het laboratorium zichzelf op teken dienen te controleren.

4.2 Incubatie van teken

De aanvrager geeft aan dat teken tijdens het nemen van een bloedmaaltijd en de periode erna tot het beëindigen van het experiment, worden geïncubeerd in een afgesloten tekenvoedingssysteem of buisje, die met een laag water van 1 cm diep en dubbelzijdig tape worden omringd.

De COGEM adviseert als aanvullende maatregel om zeep toe te voegen aan het water om de oppervlaktespanning te verlagen (1% zeepoplossing). De COGEM is van oordeel dat de incubatie van teken in een afgesloten systeem, in combinatie met de dubbele fysieke barrière (water met zeepoplossing en dubbelzijdig tape), voldoende waarborg zijn om ontsnapping van (geïnfecteerde) teken te voorkomen.

4.3 Overzetten van vervelde teken buiten VK-II

Na de bloedmaaltijd worden geïnfecteerde teken regelmatig gecontroleerd op vervellen en eventuele besmetting met schimmels. Na vervelling zal een teek worden overgezet naar een schoon reageerbuisje. Met schimmel besmette teken zullen worden afgedood. Deze werkzaamheden zullen plaatsvinden buiten de VK-II onder de eerder beschreven condities.

Aangezien er tijdens het overzetten van vervelde teken naar een schoon reageerbuisje geen aerosolvorming plaatsvindt, is de COGEM van oordeel dat deze handelingen buiten de VK-II kunnen worden uitgevoerd. De COGEM adviseert als aanvullende maatregel dat deze handelingen worden uitgevoerd in een bak die aan de randen is afgezet met tape, en zich in de 'tick-arena' bevindt.

4.4 Homogeniseren van teken in de 'bullet blender'

De aanvrager zal het virus uit geïnfecteerde teken isoleren door de teken te homogeniseren met een 'bullet blender'. Dit zal buiten de VK-II gebeuren. De aanvrager geeft aan dat incidenteel een buisje na

homogeniseren geopend of beschadigd is. Vanwege het mogelijk ontstaan van aerosolen, dragen de medewerkers mondkapjes (P2 of hogere specificatie) en handschoenen.

De COGEM signaleert dat het dragen van een mondkapje in geval van aerosolen met gg-TBEV onvoldoende bescherming aan de medewerker biedt, omdat flavivirussen ook via de oogmucosa kunnen worden overgedragen. Vanwege ARBO-overwegingen geeft de COGEM de aanvrager ter overweging om de medewerkers verder te beschermen door middel van het dragen van oogbescherming. Ook geeft de COGEM ter overweging om in plaats van 'safe-lock' buisjes, bij het homogeniseren van de teken gebruik te maken van schroefdopbuisjes om de kans op incidenten verder te verminderen.

De COGEM merkt op dat het onduidelijk in het protocol genoteerd is hoe een medewerker dient te handelen in geval van een incident (geopend of beschadigd buisje).

4.5 Recombinatie met in teken aanwezige virussen

De aanvrager zal schapenteken, egelteken en hondenteken uit het wild infecteren met gg-TBEV. Teken kunnen verschillende pathogenen, waaronder virussen, bij zich dragen en overbrengen.¹⁷ Recombinatie 'events' van TBEV zijn nooit waargenomen, zelfs niet in een studie waarin actief gezocht is naar recombinitie tussen TBEV mutanten.¹⁸ Eventuele recombinitie tussen flavivirussen zal hoogstwaarschijnlijk leiden tot het ontstaan van virussen met verminderde levensvatbaarheid.^{19,20}

De COGEM is van oordeel dat de kans op recombinitie van gg-TBEV met in teken aanwezige virussen en het mogelijk risico daarvan verwaarloosbaar klein zijn.

4.6 Conclusie

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat het risico voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden met gg-TBEV in teken verwaarloosbaar klein is, indien de werkzaamheden plaatsvinden op ML-III inperkingsniveau en naast de door de aanvrager voorgestelde maatregelen, ook de volgende aanvullende maatregelen in acht worden genomen:

- Het afzetten van de laboratoriumruimte waar met teken gewerkt wordt door dubbelzijdig tape te plaatsen bij deruopeningen en dat regelmatig te vervangen;
- Handelingen buiten de VK-II, zoals het overzetten van vervelde teken, dienen te worden uitgevoerd in een bak die aan de randen is afgezet met tape, in de 'tick-arena';
- De medewerker dient, in het onwaarschijnlijke geval van de ontsnapping van een (geïnfecteerde) teek, bij het verlaten van het laboratorium gecontroleerd te worden op teken;
- Het toevoegen van zeep aan de waterbarrière om de oppervlaktespanning te verlagen (1% zeepoplossing) tijdens de incubatie van teken.

Vanuit ARBO-overwegingen signaleert de COGEM dat het risico voor laboratoriummedewerkers bij de voorgenomen werkzaamheden verder ingeperkt kan worden door tijdens het homogeniseren van de teken indien mogelijk gebruik te maken van schroefdopbuisjes en het dragen van oogbescherming.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus (bezocht: 10 maart 2020)
2. Ecker, M. *et al.* (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 80: 179–185.
3. Stadler, K *et al.* (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71:8475–8481
4. World Health Organization. <https://www.who.int/ith/vaccines/tbev/en/> (bezocht: 17 maart 2020)
5. Dumpis U *et al.* (1999). Tick-borne encephalitis. *Clin Infect. Dis.* 28: 882-890
6. Lindquist L *et al.* (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 371:1861-1871
7. Deviatkin AA *et al.* (2020). Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? *Viruses*. 12. pii: E247. doi: 10.3390/v12020247
8. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/vhf/tbe/transmission/index.html> (Bezocht: 10 maart 2020)
9. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet> (bezocht: 13 maart 2020)
10. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. <https://www.rivm.nl/tekenencefalitis> (bezocht: 10 maart 2020)
11. Barker SC *et al.* (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129:s15-36
12. COGEM (2012). Classificatie Humaan- en dierpathogene parasieten. COGEM advies CGM/120127-01
13. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. <https://www.rivm.nl/tekenbeten-en-lyme/teek> (bezocht: 10 maart 2020)
14. Madison-Antenucci S *et al.* (2020). Emerging tick-borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00083-18; DOI: 10.1128/CMR.00083-18
15. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/190905-02
16. COGEM (2019). Omlaagschaling van werkzaamheden met van Tick-borne encephalitis virus (TBEV) afgeleide ‘Single Round Infectious Particles’. COGEM advies CGM/190725-02
17. Madison-Antenucci S *et al.* (2020). Emerging tick-borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00083-18; DOI: 10.1128/CMR.00083-18
18. Taucher C. *et al.* (2010). A trans-Complementing Recombination Trap Demonstrates a Low Propensity of Flaviviruses for Intermolecular Recombination. *J. Virol.* 84:599-611.
19. McGee CE *et al.* (2011). Stability of yellow fever virus under recombinatory pressure as compared with chikungunya virus. *PLoS One.* 6:e23247. doi: 10.1371/journal.pone.0023247
20. Monath TP *et al.* (2005) Recombination and flavivirus vaccines: a commentary. *Vaccine* 23:2956-2958