

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 augustus 2023
KENMERK CGM/230828-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met chimeer BinJV/PCV en VEEV TC-83 replicondeeltjes in muggen op ML-II

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een 2.8 combinatieverzoek IG 20-245_2.8-002 getiteld 'Chimere virussen II en III', ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van handelingen met genetische gemodificeerde (chimere) flavivirussen en alfavirus-replicondeeltjes in combinatie met muggen. Hiervoor zijn het Binjari virus (BinJV) en het Palm Creek virus (PCV) gemodificeerd zodat zij de structurele genen (prME) bevatten van het Zika virus (ZIKV) of het West Nile virus (WNV). De replicondeeltjes zijn afgeleid van de *Venezuelan equine encephalitis virus* stam TC-83 (VEEV TC-83). De aanvrager is voornemens muggen te infecteren met deze chimere virussen en VEEV TC-83 replicondeeltjes op ML-II in een muggendichte tent met sluis. Hierbij zullen een aantal aanvullende maatregelen genomen worden om ontsnapping van muggen te voorkomen.

BinJV en PCV zijn zogenaamde insect-specifieke flavivirussen (ISFs). Deze virussen infecteren alleen insecten en zijn niet in staat om in zoogdiercellen te repliceren. De VEEV TC-83 stam betreft een levend verzwakt VEEV-vaccin dat minder pathogeen is dan het wildtype VEEV.

De COGEM is van oordeel dat de voorgestelde werkwijze in combinatie met de aanvullende voorschriften voldoende inperking bieden om ontsnapping van muggen buiten het lab te voorkomen. De COGEM is van oordeel dat het risico van de werkzaamheden met gg-BinJV, gg-PCV en VEEV TC-83 replicondeeltjes in combinatie met muggen 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.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met chimere Binjari en Palm Creek virussen (gg-BinJV en gg-PCV) en VEEV replicondeeltjes in muggen

COGEM advies CGM/230828-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een 2.8 combinatieverzoek van Wageningen Universiteit (IG 20-245). Het betreft een aanvulling op bestaande werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-)flavivirussen Binjari virus (BinJV) en gg-Palm Creek virus (PCV), en replicondeeltjes afgeleid van het alfavirus *Venezuelan equine encephalitis virus*, stam TC-83 (VEEV TC-83). Het gg-BinJV en het gg-PCV betreffen chimere virussen waarvan de PrME-sequenties uitgewisseld zijn met die van het Zika virus (ZIKV) of het West Nile virus (WNV).

De aanvrager is voornemens muggen te infecteren met de chimere BinJV en PCV, en VEEV TC-83 replicondeeltjes ('viral replicon particle', VRP's), en verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II, buiten een veiligheidskabinet (VK-II), in een insectendichte tent met sluis. Hierbij heeft de aanvrager een aantal aanvullende maatregelen voorgesteld. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit inschalingsvoorstel met inbegrip van de aanvullende voorschriften en of hier additionele aanvullende maatregelen nodig zijn.

2. Algemene kenmerken alfavirussen

Alfavirussen (genus *Alphavirus*; familie *Togaviridae*) hebben een breed gastheerbereik en kunnen onder andere vogels, zoogdieren, vissen en insecten infecteren.^{1,2} Alfavirussen kunnen verspreid worden via bloedzuigende insecten, met name muggen.¹ Het genus *Alphavirus* kent 32 species², waaronder verscheidene soorten die ziekten veroorzaken bij mens en/of dier, zoals *Chikungunya virus* (CHIKV), *Ross River virus* (RRV), *Semliki Forest virus* (SFV), *Sindbis virus* (SINV) en *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV).³

Alfavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA-genoom van 9,7 tot 11,8 kb.² Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Op het genoom liggen twee grote 'open reading frames' (ORF's). De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden vanaf het ORF aan het 5'-uiteinde van het genoom afgelezen als een polyproteïne; na klieving door het virale protease in nsP2 worden de individuele eiwitten gevormd. Deze eiwitten zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.^{3,4} Het ORF aan het 3'-uiteinde van het genoom codeert voor de structurele eiwitten. Dit ORF komt tot expressie vanaf een subgenomisch mRNA, dat getranscribeerd wordt vanaf een interne promotor, 26S, gelegen in het gebied tussen het structurele en niet-structurele ORF.^{1,4} Virale en cellulaire proteases klieven de structurele polyproteïnes in de individuele eiwitten (C, E3, E2, 6K en E1). In sommige gevallen leidt '(-1) frame-shifting' tijdens de translatie tot de productie van een extra eiwit, TF genaamd.⁵ Aan beide uiteinden van het genoom liggen de 'non-coding regions', en het virale RNA heeft een 5'-cap-structuur en een poly-A-staart aan het 3'-uiteinde.

Het RNA in het virusdeeltje wordt omgeven door het capsid-eiwit (C) en tezamen vormen deze het nucleocapsid. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan met daarin de glycoproteïnen (envelopeiwitten, E1 en E2) die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.⁶ De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.² De assemblage en ‘budding’ van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats op het plasmamembraan van de gastheercel.⁷

2.1 VEEV TC-83

VEEV kan een milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paarden, variërend van koorts tot ernstige encefalitis. VEEV kan ook ziekte veroorzaken bij de mens. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot hersenontsteking (encefalitis),^{8,9} met soms blijvende neurologische problemen. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.⁸ Bij VEEV zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aerogene verspreiding heeft plaatsgevonden.¹⁰ Het is onduidelijk in hoeverre aerogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt.

VEEV TC-83 is een levend verzwakt VEEV-vaccin dat als veterinair vaccin toegelaten is in de VS.¹¹ Deze vaccinstam wordt ook onder een ‘Investigational New Drug protocol’ van de Amerikaanse ‘Food and Drug Administration’ (FDA) toegediend aan laboratorium- en veldmedewerkers die het risico lopen om geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV.¹²

Het vaccin is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen afkomstig van cavia’s. Het genoom van het geattenuerde virus is op 11 plaatsen gemuteerd.^{13,14} De verzwakking van het gemuteerde virus berust op 2 van deze 11 mutaties, namelijk nucleotide positie 3 in de 5’ non-coding regio en de mutatie op positie 120, gelegen in structureel eiwit E2, dat resulteert in de verandering van het aminozuur threonine naar arginine.^{14,15} Reversie naar wildtype VEEV is niet uitgesloten.¹⁶

3. Algemene kenmerken flavivirussen

Flavivirussen (genus *Orthoflavivirus*, familie *Flaviviridae*) zijn arbovirussen en kunnen via muggen (met name *Culex* spp. of *Aedes* spp.) en andere bloedzuigende geleedpotigen (o.a. teken) worden overgedragen. Zoogdieren en vogels zijn de primaire gastheren. Binnen het genus *Orthoflavivirus* zijn 53 virussoorten ondergebracht,¹⁷ waaronder soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij mens of dier. De soorten met de grootste wereldwijde gezondheidsimplicaties voor de mens zijn West Nile virus (WNV), Yellow fever virus (YFV), Japanse encefalitis virus (JEV), Dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV) en Tick-borne encefalitis virus (TBEV).^{18,19} Met uitzondering van TBEV, dat wordt overgedragen door teken, verspreiden WNV, YFV, JEV, DENV en ZIKV via muggen naar de mens.

Naast flavivirussen die bij vertebraten infecties kunnen veroorzaken, zijn er ook flavivirussen die alleen insecten maar geen vertebraten kunnen infecteren (insect-specifieke flavivirussen; ISF’s). ISF’s zijn niet in staat te repliceren in cellen van vertebraten.²⁰ Dit kan te maken hebben met barrières in het vermogen van het virus de cel binnen te dringen, in de cel te repliceren, of virusdeeltjes te assembleren en uit de cel vrij te komen, maar ook met het immuunsysteem van de gastheer.^{20,21}

Flavivirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kb en de virusdeeltjes zijn omhuld door een lipidemembraan.^{18,19,22} Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne, waarbij het ORF aan weerszijden wordt geflankeerd door een ‘untranslated region’ (UTR).²³ Door splitsing van het polyproteïne worden verschillende structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.^{17,22} Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn envelopeiwitten, die zich in de lipidemembraan om de nucleocapside bevinden. (pr)M en E zijn betrokken bij de binding van het virus aan de cellulaire receptor, de fusie van het virale membraan (de ‘envelop’) met het membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.²² De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA-replicatie en de verwerking van het polyproteïne.²⁴ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij ‘budding’ via het ER-membraan optreedt.²⁵

3.1 West Nile virus (WNV) en Zika virus (ZIKV)

Infecties met het WNV (tegenwoordig *Orthoflavivirus nilense*) en ZIKV (tegenwoordig *Orthoflavivirus zikaense*) verlopen veelal asymptomatisch, maar in sommige gevallen kan infectie resulteren in zeer ernstige gezondheidsproblemen en sterfte. WNV is een virus dat circuleert in vogels. Het virus kan echter ook mensen, andere zoogdieren (o.a. paarden), amfibieën en reptielen infecteren.²⁶ ZIKV is oorspronkelijk geïsoleerd uit non-humane primaten.²⁷ Zowel WNV als ZIKV kunnen bij mensen neurologische problemen veroorzaken, zoals meningitis of encefalitis.^{28,29} In zeldzame gevallen kan een ZIKV-infectie het Guillain Barré Syndroom veroorzaken, een neuromusculaire verlamming die ontstaat doordat het afweersysteem het zenuwstelsel aanvalt.^{30,31,32} In het geval van ZIKV kan infectie gedurende de zwangerschap (met name in het eerste of tweede trimester) voor ernstige neurologische problemen (onder andere microcefalie) zorgen bij het ongeboren kind.^{29,32}

Directe transmissie van mens naar mens (zonder tussenkomst van muggen) is zeldzaam, maar voor sommige flavivirussen wel gerapporteerd bij bijvoorbeeld orgaantransplantatie of bloedtransfusie. WNV kan in zeldzame gevallen tussen mensen overgedragen worden via moedermelk of transplacentaal (van moeder naar kind). Ook is transmissie naar laboratoriummedewerkers gerapporteerd.³³ Voor ZIKV kan overdracht van moeder op kind optreden tijdens de zwangerschap of rondom de bevalling. Daarnaast is ZIKV ook als enige flavivirus seksueel overdraagbaar.^{34,35}

3.2 Binjari Virus (BinJV) en Palm Creek virus (PCV)

Het PCV is een in 2013 ontdekt ISF dat in muggen van de soort *Coquillettidia xanthogaster*, maar ook in *Culex* species voorkomt.³⁶ Voor PCV is aangetoond dat dit virus niet in staat is te repliceren in verschillende cellijnen van vertebraten.^{36,37} BinJV is geïsoleerd uit *Aedes normanensis* en voor het eerst gekarakteriseerd in 2016.³⁸ Hoewel de structurele eiwitten prME van BinJV de binnenkomst van het virus in cellen van vertebraten faciliteren, blijkt dit proces inefficiënt en vindt replicatie van het virus in vertebratencellen niet plaats.^{38,39}

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt een uitbreiding op een eerdere vergunning waarover de COGEM reeds geadviseerd heeft. Dit betrof *in vitro* experimenten met onder andere de chimere BinJV en PCV virussen, die ook in onderhavige aanvraag toegepast zullen worden: BinJV backbone met de structurele eiwitten (prME) van ZIKV (BinJV/ZIKV), BinJV backbone met de structurele eiwitten (prME) van WNV (BinJV/WNV), PCV backbone met de structurele eiwitten (prME) van ZIKV (PCV/ZIKV) en PCV backbone met de structurele eiwitten (prME) van WNV (PCV/WNV). In de huidige aanvraag verzoekt de aanvrager infectie-experimenten met deze chimere virussen uit te voeren in muggen.

Daarnaast wil de aanvrager een bestaande kennisgeving uitbreiden met de infectie van muggen met VRP's afgeleid van VEEV-TC-83. De VEEV TC-83 VRP's worden vervaardigd in cellijnen onder een eerdere vergunning. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een split-helper systeem en worden als donorsequenties verschillende reporter genen gebruikt, en worden de capsid- en envelopeiwitten van VEEV-TC83 via individuele helperplasmiden *in trans* aangeboden. Er zullen dus geen chimere replicondeeltjes geproduceerd worden.

4.1 Muggensoorten

Voor de infectie-werkzaamheden worden de steekmug (*Culex pipiens*) en de gelekoortsmug (*Aedes aegypti*) uit eigen kweek gebruikt. *C. pipiens* is ongeveer 4-10 mm groot en is een zeer algemeen voorkomende soort in Europa, waaronder Nederland. Vrouwjesmuggen voeden zich met bloed van verschillende vertebraten, waaronder vogels en mensen.⁴⁰ *A. aegypti* is ongeveer 4-7 mm groot en wordt incidenteel aangetroffen in Nederland, maar wordt hier bestreden, waardoor de mug zich niet in Nederland heeft gevestigd.⁴¹ De gelekoortsmug zuigt voornamelijk bloed bij mensen. De eitjes van deze soort kunnen de winter in gematigde streken niet overleven.⁴² Met behulp van PCR en immunostaining is aangetoond dat in de muggen uit eigen kweek geen nauwverwante alfa- en flavivirussen aanwezig zijn.

4.2 Voorzieningen in het ML-II lab

Alle experimentele handelingen met levende muggen in combinatie met gg-virus of VRP's vinden plaats in een werkruimte omgeven door insectengaas (de muggentent), welke ook een sluis bevat die afgesloten wordt met een rits. In de tent en in de sluis zijn muggenvallen geplaatst en in de tent is een elektrische insectenzuiger aanwezig. In het laboratorium waar de muggentent staat, bevindt zich een lichtval. De muggen worden gehouden in containers die zijn afgedekt met knuttengaas. Per container worden maximaal 50 muggen gehouden. Om de muggen te infecteren worden de VEEV VRP's of het chimere virus (gg-BinJV of gg-PCV) met bloed gemengd in een VK-II op het ML-II lab. Het materiaal dat het VK-II verlaat wordt met 70% ethanol afgenomen om aerogene verspreiding of verspreiding via fomieten te voorkomen. De muggen worden geïnfecteerd tijdens een bloedmaaltijd, door gebruik te maken van een zogenaamde 'Hemotek feeder', die geheel dicht is en afgesloten is met parafilm, zodat geen aerogene verspreiding op kan treden. De 'Hemotek feeder' met infectieus bloed wordt op de container met muggen geplaatst. De muggen kunnen dan door het gaas van de container en het parafilm membraan van de 'Hemotek feeder' heen het bloed tot zich nemen. Na de bloedmaaltijd worden de muggen 1 tot 2

weken in afgesloten dozen in een klimaatkast van het ML-II lab geplaatst. Alleen wanneer dit nodig is voor het experiment, bijvoorbeeld bij het verzamelen van muggenspeeksel en de dissectie van de maag/darm, worden de muggen na verdoving met CO₂ uit hun container gehaald, hetgeen altijd in de muggendichte tent met sluis plaatsvindt.

Tijdens de werkzaamheden zullen de volgende aanvullende voorschriften gehanteerd worden:

- Open handelingen met muggen worden uitgevoerd in een insectendichte tent;
- In het ML-II lab, en in de werkruimte en sluis van de insectentent zijn voor de muggen geschikte vallen aangebracht;
- Voorafgaand aan het openen van de insectenkooien worden de insecten geïmmobiliseerd met een gevalideerde methode. Tijdens de werkzaamheden worden de insecten met een gevalideerde methode immobiel gehouden. Na afloop van de handelingen worden de insecten overgezet in een container die gesloten is, voordat de insecten mobiel worden;
- Bij aanvang en beëindiging van het experiment, voor opening van de container en na terugplaatsing van de muggen, worden alle levende en dode insecten geteld, met als doel vast te stellen dat er geen muggen zijn ontsnapt;
- Tijdens de handelingen met gg-virus/VRP's in de muggentent wordt een mond- en neuskapje, P2 of hogere specificatie, en een veiligheidsbril gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen).

Aanvullend zijn door de vergunningverlener (bureau GGO) de volgende voorschriften voorgesteld:

- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van ZIKV, WNV en andere verwante virussen;
- Hoofdhaar, baard en/of snor (indien aanwezig) zijn met een haarkapje of iets vergelijkbaars afgedekt;
- De handelingen vinden plaats met inachtneming van de protocollen zoals beschreven in de aanvraag.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft de flavivirussen WNV⁴³ en ZIKV⁴⁴ ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. PCV⁴⁵ en BinJV⁴⁶ zijn als strikt-dierpathogene (insect-specifieke) virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. VEEV stam TC-83 is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁴⁷

De COGEM heeft in 2020 tweemaal geadviseerd over werkzaamheden met gg-flavivirus chimere in associatie met animale cellen,⁴⁸ waaronder de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met de chimere BinJV en PCV die ZIKV/WNV structurele genen bevatten (i.e., dezelfde gg-virussen die in onderhavige aanvraag aan muggen worden toegediend).⁴⁶ Voor de werkzaamheden met gg-BinJV en gg-PCV in animale cellen was de COGEM van oordeel dat de virulentie en het tropisme van deze gg-virussen onveranderd is ten opzichte van wildtype BinJV en PCV, en dat deze virusdeeltjes niet in staat zijn om vertebratencellen te infecteren. De COGEM adviseerde de *in vitro* werkzaamheden met gg-BinJV en

gg-PCV uit te voeren op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van de volgende aanvullende maatregelen:

- het dragen van handschoenen;
- het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II;
- en zorg dragen dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van ZIKV, WNV en andere verwante virussen.

Over VEEV repliconsystemen heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd, waaronder over *in vitro* werkzaamheden met gg-VEEV replicons met verscheidene donorsequenties.^{e.g.,49,50,51} Daarnaast heeft zij een generiek advies uitgebracht over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met alfa- en flavivirus replicons en VRP's.⁵² Over *in vivo* werkzaamheden met VEEV VRP's in muggen heeft zij nog niet eerder geadviseerd.

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd over experimenten met chimere flavivirussen in associatie met muggen (*C. pipiens* en *Ae. aegypti*). In 2015 heeft zij geadviseerd werkzaamheden met volvirulent gg-WNV in associatie met muggen op ML-III in te schalen, met inachtneming van een aantal aanvullende voorschriften.⁵³ Later, in 2017 heeft zij geadviseerd om werkzaamheden met volvirulent en gg-ZIKV en gg-YFV in muggen eveneens op ML-III in te schalen, eerder aan de eerdere inschaling voor gg-WNV.⁵⁴

6. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met chimere virussen BinJV/WNV, BinJV/ZIKV, PCV/WNV, PCV/ZIKV en VEEV TC-83 VRP's in muggen op ML-II. Hierbij zal gewerkt worden in een muggentent met sluis en zullen aanvullende voorschriften gehanteerd worden. Voor de overweging van de inschaling van de werkzaamheden met de chimere virussen en VEEV TC-83 replicons spelen de volgende aspecten een rol; de aanwezigheid van of de vorming van replicatiecompetent virus (RCV) en de kans op verspreiding via de medewerker of de mug. BinJV/WNV, BinJV/ZIKV, PCV/WNV en PCV/ZIKV betreffen replicatiecompetente chimere virussen, die nieuwe infectieuze gg-virusdeeltjes kunnen produceren in de mug. Derhalve wordt voor deze virussen enkel ingegaan op de mogelijkheid tot verspreiding. Voor de VEEV TC-83 VRP's wordt wel gekeken naar de aanwezigheid van RCV en mogelijke recombinitie tijdens de productie of experimenten.

6.1 Aanwezigheid RCV en kans op het ontstaan van RCV door recombinitie

De kans op aanwezigheid van RCV in het toe te dienen bloedmaal met VEEV TC-83 VRP's acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Het gebruikte productiesysteem is nagenoeg gelijk aan een eerder beschreven productiesysteem, waarvan de COGEM de kans op RCV verwaarloosbaar klein achtte, mits de gebruikte cellen vrij zijn van VEEV en verwante virussen.^{49,52} De aanvrager stelt dat in het huidige systeem enkel de 'self-cleavage' eigenschap van het capsid-eiwit niet verwijderd is, dat niet van invloed is op RCV vorming. De VEEV TC-83 VRP's kunnen na opname door en infectie van de mug geen nieuwe infectieuze deeltjes meer vormen vanwege de afwezigheid van de structurele genen. Verdere verspreiding van de VRP's is daardoor niet mogelijk. Gezien het feit dat de muggen uit eigen

kweek afkomstig zijn en getest zijn op verwante alfa- en flavivirussen en deze niet zijn aangetroffen, acht de COGEM de kans op recombinitie of complementatie van de VRP's (of de chimere virussen) met wildtype alfa- of flavivirussen in de muggen verwaarloosbaar klein.

6.2 Transmissie via de medewerker

Van de geïnfecteerde muggen wordt speeksel verzameld en wordt dissectie van de maag/darm verricht. Het verzamelen van speeksel neemt 45 minuten in beslag. Bij deze handeling worden bij de verdoofde muggen de vleugels en pootjes verwijderd, en wordt de zuignuit ('proboscis') gedurende 45 minuten in het puntje van een pipet met een kleine hoeveelheid vloeistof geplaatst. De muggen worden hierna ingevroren.

Intacte VEEV TC-83 VRP's of gg-BinJV/PCV zouden in theorie vrij kunnen komen tijdens de dissectie van de maag/darm of bij het verzamelen van muggenspeeksel. Vanwege de proefopzet, de kleine hoeveelheid vloeistof die wordt gebruikt en de mogelijke hoeveelheid virus in muggen, is de kans op het vrijkomen van aerosolen gering. Zoals eerder door de COGEM geadviseerd, is zij van oordeel dat het risico van aerogene overdracht van de gg-virussen en VPR's voldoende wordt voorkomen door het dragen van een veiligheidsbril en mond/neuskapje zoals opgenomen in de aanvullende voorschriften van de aanvrager.⁵³ Tevens zal het gebruik van 'sharps' tot een minimum worden beperkt en is het gebruik hiervan alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen).

In het theoretische geval dat een medewerker blootgesteld raakt aan de VEEV TC-83 VRP's of chimere virussen, acht de COGEM de kans op verspreiding naar derden via de besmette medewerker verwaarloosbaar klein. VEEV TC-83 VRP's kunnen slechts éénmalig infecteren omdat zij door afwezigheid van de structurele genen geen nieuwe virusdeeltjes vormen. Zowel PCV als BinJV zijn strikt dierpathogene virussen die alleen insecten kunnen infecteren. Eerder onderzoek naar deze chimere virussen toonde aan dat deze virussen niet repliceren in cellen van vertebraten bij 37 °C.^{20,46,38,39,55} Bepaalde antivirale eiwitten (ZAP) die aanwezig zijn in vertebraatcellen spelen hier voor bepaalde ISFs, waaronder BinJV, mogelijk ook een belangrijke rol.⁵⁶ De COGEM acht de kans op verspreiding via een onbedoeld besmette medewerker verwaarloosbaar klein.

6.3 Transmissie via de mug

Om de kans op ontsnapping van muggen te minimaliseren vinden de voorgenomen experimentele handelingen met levende muggen in combinatie met gg-virus of VRP's plaats in een muggentent met sluis. De tent en sluis zijn afgesloten met een rits en zijn voorzien van muggenvallen en een elektrische insectenzuiger. In het omliggende laboratorium bevindt zich een lichtval. Tijdens de infectiewerkzaamheden bevinden de muggen zich in containers die zijn afgedekt met knuttengaas. Het voeden gebeurt door het knuttengaas en parafilm van de afgesloten 'Hemotek feeder' heen. Hierna worden de muggen in afgesloten dozen in een klimaatkast van het ML-II lab geplaatst. Indien muggen uit de container gehaald worden, worden zij eerst verdoofd met CO₂. Hierbij wordt gewerkt in de muggendichte tent met sluis. Om vast te stellen dat er geen muggen zijn ontsnapt, worden bij aanvang

en beëindiging van het experiment, voor de opening van containers en na terugplaatsing van de muggen, alle levende en dode insecten geteld.

Vanwege deze voorzorgsmaatregelen is de COGEM van oordeel dat het voorgestelde aanvullende voorschrift om het hoofdhaar van de onderzoeker te bedekken (om te voorkomen dat een mug via het haar meelift buiten het ML-II laboratorium) geen aanvullende veiligheid bieden en derhalve niet noodzakelijk is. De COGEM is van oordeel dat de voorgestelde werkwijze en de overige genoemde aanvullende voorschriften voldoende inperking bieden om ontsnapping van muggen buiten het lab te voorkomen.

7. Conclusie

De COGEM stemt in met het inschalingsvoorstel voor de werkzaamheden met gg- BinJV, gg-PCV en VEEV TC-83 VRP's in muggen op ML-II, met inachtneming van de volgende voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Open handelingen met muggen worden uitgevoerd in een insectendichte tent;
- In het ML-II lab, en in de werkruimte en sluis van de insectentent zijn voor de muggen geschikte vallen aangebracht;
- Voorafgaand aan het openen van de insectenkooien worden de insecten geïmmobiliseerd met een gevalideerde methode. Tijdens de werkzaamheden worden de insecten met een gevalideerde methode immobiel gehouden. Na afloop van de handelingen worden de insecten overgezet in een container die gesloten is, voordat de insecten mobiel worden;
- Bij aanvang en beëindiging van het experiment, voor opening van de container en na terugplaatsing van de muggen, worden alle levende en dode insecten geteld, met als doel vast te stellen dat er geen muggen zijn ontsnapt;
- Tijdens de handelingen met gg-virus/VRP's in de muggentent wordt een mond- en neuskapje, P2 of hogere specificatie, en een veiligheidsbril gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen);
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van ZIKV, WNV en andere verwante virussen;
- De handelingen vinden plaats met inachtneming van de protocollen zoals beschreven in de aanvraag.

De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

2. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Togaviridae*.
<https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 16 augustus)
3. Pietilä MK *et al.* (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234: 44-57
4. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
5. Firth AE *et al.* (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol. J.* 5:108
6. Jose J *et al.* (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837–856
7. Elmasri Z *et al.* (2021). Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. *Pathogens* 10: 984
8. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
9. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
10. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
11. Guerbois *et al.* (2013). IRES-driven expression of the capsid protein of the Venezuelan equine encephalitis virus TC-83 vaccine strain increases its attenuation and safety. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: 7: e2197
12. Grabenstein JD *et al.* (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol. Rev.* 28: 3-26
13. Kinney RM *et al.* (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
14. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
15. Kulasegaran-Shylini R *et al.* (2009). The 5'UTR-specific mutation in VEEV TC-83 genome has a strong effect on RNA replication and subgenomic RNA synthesis, but not on translation of the encoded proteins. *Virology* 387: 211-221
16. Kenney JL *et al.* (2011). Stability of RNA virus attenuation approaches. *Vaccine* 29: 2230-2234
17. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus *Orthoflavivirus*.
<https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus> (bezocht: 16 augustus 2023)
18. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
19. Laureti M *et al.* (2018). Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. *Front. Immunol.* 9: 2180
20. Piyasena TBH *et al.* (2017). Infectious DNAs derived from insect-specific flavivirus genomes enable identification of pre- and post-entry host restrictions in vertebrate cells. *Sci. Rep.* 7: 2940
21. Junglen S *et al.* (2016). Host range restriction of insect-specific flaviviruses occurs at several levels of the viral life cycle. *mSphere.* 2: e00375-16
22. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
23. 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

24. 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
25. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: Fields Virology. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
26. Chancey C *et al.* (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. Biomed. Res. Int. Article ID 376230.
27. Gutierrez-Bugallo G *et al.* (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. Nat. Ecol. Evol., 3: 561-569
28. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2018). <https://www.rivm.nl/arbovirussen> (bezocht: 16 augustus 2023)
29. Best SM (2016). Flaviviruses. Curr. Biol. 26: R1258-R1260
30. Oehler E *et al.* (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. www.eurosurveillance.org
31. Cao-Lormeau V-M *et al.* (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Lancet Infect. Dis. 387: 1531-1539
32. Miner JJ & Diamond MS (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. Cell Host Microbe 21: 134-142
33. World Health Organization (WHO, 2017). West Nile virus Key facts. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus> (bezocht: 27 oktober 2020)
34. World Health Organization (WHO, 2017). Zika virus Key facts <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> (bezocht: 16 augustus 2023)
35. Sakkas H *et al.* (2018). An update on sexual transmission of Zika virus. Pathogens 7: 66
36. Hobson-Peters J *et al.* (2013). A new insect-specific flavivirus from Northern Australia suppresses replication of West Nile Virus in co-infected mosquito cells. Plos One. 9: e56534
37. COGEM (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. Onderzoeksrapport CGM/2019-01
38. Hobson-Peters J *et al.* (2019). A recombinant platform for flaviviruses vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. Sci. Transl. Med. 11:eaax7888
39. Harrison JJ *et al.* (2020) Antigenic characterization of new lineage II insect-specific Flaviviruses in Australian mosquitoes and identification of host restriction factors. mSphere 5:e00095-20
40. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Culex pipiens* – factsheet for experts. <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/related-public-health-topics/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets> (bezocht: 8 augustus 2023)
41. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Gelekoortsmug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knutten-en-teken/gelekoortsmug> (bezocht: 8 augustus 2023)
42. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Aedes aegypti* - Factsheet for experts. <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-aegypti> (bezocht: 8 augustus 2023)
43. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02

44. COGEM (2016). Classificatie van en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Zika virus*. COGEM advies CGM/160307-01
45. COGEM (2019). Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
46. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie van het Binjari virus en inschaling van werkzaamheden met (chimere) flavivirussen. COGEM advies CGM/201210-02
47. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van *Venezuelan equine encephalitis virus* vaccinstam TC-83. COGEM advies CGM/170328-05
48. COGEM (2020). Inschaling werkzaamheden met flavivirus en alphavirus chimeren. COGEM advies CGM/201105-01.
49. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties. COGEM advies CGM/171030-03
50. COGEM (2017). Omlaagschaling van in vivo en in vitro werkzaamheden met *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
51. Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM advies CGM/171024-01
52. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM advies CGM/221223-01
53. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met gg-Chikungunya virus en gg-West Nile virus in combinatie met muggen. COGEM advies CGM/150907-02
54. COGEM (2017). Inschaling van werkzaamheden met gg-Zikavirus en gg-Yellow fever virus in associatie met muggen. COGEM advies CGM/170720-01
55. Piyasena TBH *et al.* (2019). Chimeric viruses of the insect-specific flavivirus Palm Creek with structural proteins of vertebrate-infecting flaviviruses identify barriers to replication of insect-specific flaviviruses in vertebrate cells. *J. Gen. Virol.* 100: 1580-1586
56. Colmant AMG *et al.* (2021). Insect-Specific Flavivirus replication in mammalian cells is inhibited by physiological temperature and the Zinc-Finger Antiviral Protein. *Viruses* 13: 573