

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

DATUM 19 december 2023
KENMERK CGM/231219-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met chimere flavivirussen op ML-III

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een uitbreiding van het dossier IG 20-208_III-001 leidend tot IG 20-208_III-003 getiteld 'Productie van - en infectie met chimere virussen in animale cellen (III)', ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (chimere) flavivirussen. De aanvrager is voornemens de chimere virussen te produceren in insecten- en animale cellen, en vervolgens insecten en animale cellen te infecteren met deze chimeren. De chimeren zijn gebaseerd op Tick-borne encephalitis virus (*Orthoflavivirus encephalitidis*, TBEV) en het Usutu virus (*Orthoflavivirus usutuense*, USUV) waarin (een aantal) structurele genen of een gedeelte van de 3'UTR regio met elkaar worden uitgewisseld.

De chimeren zullen bestaan uit een combinatie van een klasse 3 (TBEV) en een klasse 2 (USUV) pathogeen. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat de chimere virussen meer pathogeen of virulent zullen zijn dan de betreffende oudervirussen, maar zij kan niet uitsluiten dat de pathogeniteit of virulentie van de chimere virussen vergelijkbaar kunnen zijn met die van de oudervirussen (TBEV en USUV).

Alles in overweging nemende kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden, met inachtneming van het voorgestelde aanvullende voorschrift. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, onder navolging van het voorgestelde voorschrift, de risico's 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 prof. dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met chimere flavivirussen

COGEM advies CGM/231219-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 20-208) over de inschaling van werkzaamheden met verschillende genetisch gemodificeerde (gg-)flavivirussen. De aanvraag is afkomstig van de Wageningen Universiteit. De aanvrager is voornemens de chimere virussen te produceren in insecten- en animale cellen, en vervolgens insecten en animale cellen te infecteren met deze chimeren. De chimeren bestaan uit verschillende combinaties van Tick-borne encephalitis virus (*Orthoflavivirus encephalitis*, TBEV) en het Usutu virus (*Orthoflavivirus usutuense*, USUV). Het betreft chimere USUV virussen waarvan (een aantal van de) structurele genen of een gedeelte van de 3'UTR regio uitgewisseld is met die van TBEV, en andersom. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-III. Hierbij wordt een aanvullend voorschrift gehanteerd. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit inschalingsvoorstel met inbegrip van het aanvullende voorschrift.

2. Achtergrondinformatie over de gebruikte virussen

2.1 Algemene kenmerken van flavivirussen

Flavivirussen (genus *Orthoflavivirus*, familie *Flaviviridae*) zijn arbovirussen en worden via muggen (met name *Culex* spp. of *Aedes* spp.) en andere bloedzuigende geleedpotigen (o.a. teken) overgedragen¹. Zoogdieren en vogels zijn de primaire gastheren. Binnen het genus *Orthoflavivirus* zijn 53 virussoorten ondergebracht, waaronder soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij mens of dier. De soorten met de grootste wereldwijde gezondheidsimplicaties voor de mens zijn West Nile virus (*Orthoflavivirus nilense*, WNV), Yellow fever virus (*Orthoflavivirus flavi*, YFV), Japanse encephalitis virus (*Orthoflavivirus japonicum*, JEV), Dengue virus (*Orthoflavivirus denguei*, DENV), Zika virus (*Orthoflavivirus zikaense*, ZIKV) en Tick-borne encephalitis virus (*Orthoflavivirus encephalitis*, TBEV).^{2,3} Met uitzondering van TBEV, dat wordt overgedragen door teken, verspreiden de genoemde virussen via muggen naar de mens.

Flavivirussen hebben een positief RNA genoom van ongeveer 11 kb, wat codeert voor één 'open reading frame' (ORF), en de virusdeeltjes zijn omhuld door een membraan.^{4,5} De 5' en 3' 'untranslated regions' (UTR's) zijn belangrijk voor de RNA-replicatie en de translatie 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 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5), waaronder het RNA-polymerase. Het nucleocapside C, en de oppervlakte-eiwitten (pr)M 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 ontstaat het infectieuze virusdeeltje.^{4,6} De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij budding via het ER membraan optreedt.⁵

2.2 Tick-born encephalitis virus (TBEV)

Er zijn drie verschillende subtypes van TBEV (*Orthoflavivirus encephalitis*): het Europese (TBEV-Eu), het Far-Eastern (TBEV-FE) en het Siberian subtype (TBEV-Sib).^{1,6} TBEV-Eu is het meest voorkomende TBEV subtype in West-Europa. Alle subtypen worden overgedragen door teken (*Ixodes* spp.). De belangrijkste gastheren zijn kleine knaagdieren. Mensen, grotere zoogdieren en vogels worden incidenteel geïnfecteerd, door een tekenbeet, of zeer incidenteel na het consumeren van geïnfecteerde ongepasteuriseerde melkproducten.^{7,8,9} Tekenen kunnen geïnfecteerd raken door een bloedmaal van een geïnfecteerde gastheer.¹⁰

De ziekteverschijnselen en de ernst van de ziekte zijn afhankelijk van het subtype van het virus en de leeftijd van de gastheer. Vaak verloopt infectie met TBEV 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 één tot twee procent overlijdt. Er is geen behandeling van TBEV infectie beschikbaar; vaccinatie tegen TBEV is wel mogelijk.^{11,12}

Tot op heden is TBEV niet endemisch in Nederland. Tussen 2016 en 2022 zijn 16 gevallen bekend van besmetting met TBEV bij mensen in Nederland.¹³ Deze gevallen kwamen voor in de Sallandse Heuvelrug, de Utrechtse Heuvelrug, centraal Noord-Brabant, het noordoosten van de Flevopolder, Twente, de Achterhoek en Terschelling.

2.3 Usutu virus (USUV)

USUV (*Orthoflavivirus usutuense*) wordt door steekmuggen (voornamelijk *Culex* spp.) overgedragen naar vogels. Er zijn in meer dan 50 verschillende vogelsoorten antilichamen tegen USUV aangetroffen.¹⁴ Voor bepaalde vogelsoorten kan infectie fataal zijn. De meeste sterftegevallen worden waargenomen bij merels (*Turdus merula*).¹⁵ USUV heeft een breed weefseltropisme en sterfte wordt waarschijnlijk veroorzaakt door meervoudig orgaanfalen, of door laesies in de hersenen (als gevolg van encefalitis en neuronale necrose).¹⁶ Neuropathologie is kenmerkend voor flavivirussen, maar USUV heeft als uniek kenmerk dat het demyelinisatie kan veroorzaken.¹⁷

Het virus kan door muggen ook overgedragen worden naar mensen en andere zoogdieren (zoals paarden, knaagdieren en het virus is ook geïsoleerd uit twee vleermuizen¹⁸), die beschouwd worden als ‘dead-end’ gastheer. In 1981 is het virus in Afrika voor het eerst geïsoleerd uit een man met koorts en huiduitslag, en later in 2004 bij een kind met koorts en geelzucht.¹⁹ Ook is het virus tijdens een USUV-uitbraak onder wilde vogels in Oostenrijk aangetoond in het bloed van een man met huiduitslag.²⁰ Naast milde klachten zijn er ook enkele gevallen beschreven waarbij ernstigere klachten geassocieerd zijn met USUV-infectie. Zo zijn in 2009 in Italië twee gevallen beschreven waarbij USUV geïsoleerd werd uit patiënten met ernstige neurologische verschijnselen. In beide gevallen betrof het

immuungecompromitteerde patiënten.^{21,22} Uit seroprevalentiestudies en analyses van bloeddonaties blijkt dat er een lage en asymptomatische seroprevalentie is onder de Europese bevolking.^{20,23,24,25,26,27}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt om een uitbreiding van een eerdere vergunning waarover de COGEM reeds geadviseerd heeft.²⁸ Dit betrof werkzaamheden met de productie van chimere virussen in animale cellen, om hiermee vervolgens cellen te infecteren. De chimeren in de oorspronkelijke vergunning bestaan onder andere uit uitwisseling van niet-structurele en structurele genen van ZIKV of WNV met USUV. In de huidige aanvraag verzoekt de aanvrager om zes verschillende gg-TBEV en gg-USUV virussen te produceren. Hierbij zullen combinaties worden gemaakt tussen de 'backbones' van TBEV-Eu en USUV en combinaties van de structurele eiwitten of een deel van de 3'UTR regio.

Naast de 6 chimere virussen, wordt een 'full length' TBEV DNA geproduceerd. Voor de productie van de zeven (chimere) flavivirussen wordt gebruik gemaakt van de CPER methode, waarbij het virale genoom samengesteld wordt uit verschillende PCR-producten door overlappende fragmenten te fuseren.²⁹ Dit leidt tot een circulair DNA-molecuul (plasmide), dat naar cellen wordt getransfecteerd, waarna het virale RNA vanaf een promoter op het DNA-product tot expressie wordt gebracht en de chimere virussen geproduceerd worden.

Naast de productie van chimere virussen verzoekt de aanvrager de gastheercellijnen uit te breiden met de HEK293T, A549 en CPE/LULS50 cellijnen. De te gebruiken gastheercellijnen worden hiermee: HeLa, HeLa G3BP knockout, BHK21, U2OS, U2OS G3BP Knock out, C6/36, Aag2, Ap-61, CxT, C7/10, HSU, Chao ball, Vero, DF-1, U4.4, RML-12, A549, CPE/LULS50, HEK293T.

De aanvrager verzoekt om de productie van deze chimere virussen en de infectie van insecten- en animale cellen met deze virussen uit te voeren op inperkingsniveau ML-III met inachtneming van de volgende aanvullende maatregel:

- 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).

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft TBEV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.³⁰ USUV is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³¹

De COGEM heeft eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-flavivirus chimeren bestaande uit een combinatie van pathogeniteitsklasse 2 en 3 virussen (o.a. USUV, ZIKV en WNV) in associatie met animale cellen.²⁸ De COGEM adviseerde de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-III met inachtneming van de volgende (aanvullende) maatregelen:

- Het uitvoeren van open handelingen in veiligheidskabinet van klasse II;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt;

- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan werkzaamheden met chimeren die een ZIKV component bevatten.

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met gg-flavivirus chimeren bestaande uit een combinatie van pathogeniteitsklasse 2 virussen.^{32,33}

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met chimere TBEV/USUV in associatie met en insecten- en animale cellen op ML-III. Hierbij zal als aanvullende maatregel het gebruik van 'sharps' tot een minimum worden beperkt. In alle gevallen gaat het om chimeren en een 'full length' TBEV afgeleid van een klasse 2 (USUV) en een klasse 3 (TBEV) pathogeen.

De aanvrager heeft een risicobeoordeling aangeleverd voor de werkzaamheden met TBEV/USUV chimeren. De aanvrager geeft daarbij aan dat verwacht wordt dat het tropisme, het gastheerbereik, en de transmissie van de TBEV/USUV-chimeren vergelijkbaar zullen zijn aan de wildtype virussen waaruit de chimeren zijn samengesteld. Een uitbreider gastheerbereik, tropisme of mate van virulentie of pathogeniteit wordt door de aanvrager onwaarschijnlijk geacht.

Hoewel er geen wetenschappelijke literatuur beschikbaar is over gg-USUV en gg-TBEV waarbij structurele eiwitten (C, prM, of E) of een deel van de 3'UTR regio zijn uitgewisseld, zijn er wel gegevens beschikbaar over een gg-TBEV waarin de structurele eiwitten prME zijn vervangen door die van recombinant DENV (serotype 4).³⁴ Dit gg-TBEV/DENV kan minder goed repliceren in muggencellen en is niet in staat in tekencellen te repliceren. Daarnaast is het gg-TBEV/DENV niet in staat om muggen (*Aedes aegypti*) of tekenlarven (*Ixodes scapularis*) te infecteren. Uit resultaten van een onderzoek waarbij gebruikt gemaakt werd van gg-TBEV/JEV (Japanese encephalitis virus) 'virus-like particles' (VLP's) bleek dat het gastheerbereik van deze VLP's gelijk is aan de wildtype virussen.³⁵ Daarnaast bleek uit de resultaten dat VLP's, bestaande uit TBEV replicon RNA verpakt in een JEV envelop, niet in staat waren virale eiwitten te produceren in muggencellen.

In de regel leidt uitwisseling van genen tussen verschillende virussoorten tot attenuatie.^{34,35,36} Echter aangezien dit niet met experimentele gegevens onderbouwd kan worden voor TBEV/USUV-chimeren, gaat de COGEM in haar overwegingen ervan uit dat de betreffende chimeren gelijk zijn aan de betreffende uitgangsvirussen op het gebied van pathogeniteit, gastheerbereik, transmissie en virulentie.

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III en het door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschrift: 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). De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen

werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van het hierboven genoemde aanvullende voorschrift, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. ICTV <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt: 7 december 2023)
2. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
3. Laureti M *et al.* (2018). Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. *Front. Immunol.* 9: 2180
4. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
5. Simmonds P *et al.* (2017). ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 98: 2-3
6. 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
7. Peňaziová K *et al.* (2022). Serologic investigation on Tick-Borne Encephalitis Virus, Kemerovo Virus and Tribeč Virus infections in wild birds. *Microorganisms* 10: 2397
8. Waldenström J *et al.* (2007). Migrating birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerg. Infect Dis.* 13: 1215
9. Estrada-Peña A & de la Fuente J (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral research* 108: 104-128
10. Labuda, M *et al.* (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *J. Med. Entomol.* 30: 295-299
11. European Center for Disease Control and Prevention (n.d.). Factsheet about tick-borne encephalitis (TBE). <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet> (bezoekt: 7 december 2023)
12. Kunz C *et al.* (2003). TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 21: S50-S55
13. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (n.d.). <https://www.rivm.nl/tekenencefalitis> (bezoekt: 7 december 2023)
14. Nikolay B (2015). A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109: 609-618
15. Ashraf U *et al.* (2015). Usutu virus: an emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* 7: 219-238
16. Chvala S *et al.* (2004). Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J. Comp. Path.* 131: 176-185
17. Weissenböck H *et al.* (2004). Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathol.* 108: 453-460
18. Cadar D *et al.* (2014). Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 1771-1773
19. Nikolay B *et al.* (2011). Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11: 1417-1423
20. Bakonyi T *et al.* (2017). Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Euro Surveill.* 22: 17-00644
21. Pecorari M *et al.* (2009). First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 14: 19446

22. Cavrini F *et al.* (2009). Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 14: 19448
23. Gaibani P & Rossini G (2017). An overview of Usutu virus. *Microbes Infect.* 19: 382e387
24. Gaibani P *et al.* (2012). Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 431-433
25. Allering L *et al.* (2012). Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Euro Surveill.* 17: 20341
26. Cadar D *et al.* (2017). Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Euro Surveill.* 22: 30501
27. Grottola A *et al.* (2017). Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 23: 33-37
28. COGEM (2020) Inschaling werkzaamheden met flavivirus en alphavirus chimeren. COGEM advies CGM/201105-01
29. Edmonds J *et al.* (2013). A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity. *J. Virol.* 4: 2367-2372
30. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02
31. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie Usutu virus. COGEM advies CGM/180827-01
32. COGEM (2023). Inschaling werkzaamheden met chimeer BinJV/PCV en VEEV TC-83 replicondeeltjes in muggen op ML-I. COGEM advies CGM/230828-01
33. COGEM (2012) Pathogeniteitsclassificatie en inschaling werkzaamheden (chimere) flavivirussen. COGEM advies CGM/201210-02
34. Engel A *et al.* (2011). Chimeric tick-borne encephalitis/dengue virus is attenuated in *Ixodes scapularis* ticks and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 665-674
35. Yoshii K *et al.* (2008). Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 89: 200-211
36. 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