

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

DATUM 7 maart 2016
KENMERK CGM/160307-01
ONDERWERP Advies classificatie en inschaling werkzaamheden (genetisch gemodificeerd)
Zika virus

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over vergunning IG 16-043_2.8-000 betreffende de 'Moleculaire karakterisatie van het flavivirus Zika' deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd over de pathogeniteitsklasse van het *Zika virus* (ZIKV) te adviseren. Daarnaast is zij gevraagd advies uit te brengen over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd ZIKV.

ZIKV veroorzaakt in haar oorspronkelijke verspreidingsgebied (Afrika en Azië) doorgaans een mild ziektebeeld. De huidige ZIKV-epidemie in Zuid- en Midden-Amerika wijst er echter op dat het virus mogelijk ook betrokken is bij het veroorzaken van ernstige ziekteverschijnselen, zoals microcefalie ('kleinhoofdigheid') bij de ongeboren vrucht en het syndroom van Guillain Barré (aandoening van bepaalde motorische zenuwen). De belangrijkste besmettingsroute verloopt via steekmuggen die in Nederland niet voorkomen. Ook zijn er steeds meer aanwijzingen dat het virus via seksueel contact kan worden overgedragen, en is inmiddels algemeen geaccepteerd dat het virus via de moeder de ongeboren vrucht kan infecteren. Gezien de huidige onduidelijkheid over de precieze eigenschappen van het ZIKV, adviseert de COGEM op basis van het voorzichtigheidsbeginsel het virus voorlopig in pathogeniteits-klasse 3 in te delen.

Conform haar eerdere advies over kloneringswerkzaamheden van klasse 3 virussen, adviseert de COGEM de klonering in bacteriën en het tot expressie brengen van (gg) ZIKV-genen en niet-volledige (gg) ZIKV-genomen uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. De productie van zogenaamde gg-ZIKV replicons adviseert zij in te schalen op ML-II inperkingsniveau, omdat deze in staat zijn in cellen te repliceren. Er kunnen echter geen autonoom replicerende virusdeeltjes worden gevormd, omdat de structurele genen ontbreken. Werkzaamheden met volvirulent gg-ZIKV adviseert zij conform de Regeling ggo in te schalen op ML-III inperkingsniveau. Ook werkzaamheden met volvirulent chimeer virus gebaseerd op ZIKV maar met oppervlakte-eiwitten van een *Yellow fever virus* (YFV-17D) vaccinstam, adviseert de COGEM op ML-III inperkingsniveau in te schalen, aangezien er onvoldoende bewijs is voor de vermeende verzwakking van het chimere virus en voor de mogelijke effectiviteit van vaccinatie met YF-17D. Indien de voorgenomen werkzaamheden op voornoemde inperkingsniveau's én onder navolging van de in het advies genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van mening dat 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie van en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Zika virus*

COGEM advies CGM/160307-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Zika virus* (ZIKV). De vergunningsaanvraag is ingediend door het Leiden Universitair Medisch Centrum. De werkzaamheden bestaan onder meer uit kloneringswerkzaamheden in *E. coli*, het opzetten van een reversed genetics systeem en de constructie van een chimeer virus waarbij twee genen van het ZIKV coderend voor oppervlakte-eiwitten zullen worden vervangen door die van de *Yellow fever virus* (YFV) vaccinstam YF-17D.

2. ZIKV

ZIKV behoort tot het genus *Flavivirus*, familie *Flaviviridae*, en is een positief enkelstrengs RNA-virus. Het genoom van ZIKV is ongeveer 10,7 kb groot.^{1,2,3,4} Het genomisch RNA van de flavivirussen codeert voor één enkel polyproteïne en wordt aan weerszijden geflankeerd door een non-coding region ofwel non-translated region (NTR).^{5,6,7} 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 andere twee structurele eiwitten ((pr)M en E) zijn oppervlakte-eiwitten en vormen samen met het gastheermembraan de envelop. Deze eiwitten spelen een rol bij de binding aan de cel en zijn betrokken bij de immuniteit tegen het virus. De *NS*-genen en de 5'- en 3'-NTRs zijn betrokken bij de translatie, replicatie en het inpakken van het RNA in het virusdeeltje. De *NS*-genen coderen voor helicase, polymerase of protease.^{5,6} Virusreplicatie lijkt zowel in het cytoplasma, in zogenaamde auto-fagosomen, als in de celkern plaats te vinden.^{8,9} Indien geen NTRs aanwezig zijn of wanneer deze gemuteerd zijn, vindt er geen replicatie van het virusgenoom plaats.⁷

2.1 Ziekteverschijnselen

Een ZIKV infectie verloopt doorgaans asymptomatisch, maar kan ook een milde ziekte veroorzaken die 3 tot 12 dagen duurt. Eén op de vier patiënten vertoont ziekteverschijnselen, waaronder (hoge) koorts, hoofdpijn, gewrichtspijn en huiduitslag. De ziekteverschijnselen lijken op die van griep, dengue en chikungunya.^{10,11}

Op basis van de gegevens van de huidige ZIKV-epidemie in Zuid- en Midden-Amerika lijkt er een correlatie te bestaan tussen een doorgemaakte ZIKV-infectie en afwijkingen aan het centrale zenuwstelsel (CZS) bij foetussen en pasgeborenen. Dit kan gepaard gaan met miskramen. Op 6 februari waren bij het ministerie van volksgezondheid van Brazilië 462 patiënten met microcefalie en/of andere aandoeningen aan het CZS bekend die geassocieerd werden met een infectie voor de geboorte. Op basis van laboratoriumdiagnostiek is in 8,9% van deze gevallen een ZIKV infectie aangetoond.¹² Inmiddels is ook melding gemaakt van de aanwezigheid van ZIKV-RNA of ZIKV-

antigenen in vruchtwater, placenta of hersenweefsel van foetussen of pasgeborenen met afwijkingen aan de hersenen.^{13,14,15,16,17}

Tevens lijkt er een correlatie te bestaan tussen een doorgemaakte ZIKV-infectie en het syndroom van Guillain Barré (GBS). Dit is een niet-CZS gerelateerde neuromusculaire verlamming. Deze correlatie werd voor het eerst verondersteld op basis van de gegevens van de ZIKV-epidemie in Frans-Polynesië.^{18,19} Ook in Brazilië is in 2015 een toename van GBS gevallen waargenomen ten opzichte van 2014, die mogelijk gerelateerd is met de ZIKV uitbraak in dat land. Deze toename zou echter ook het gevolg kunnen zijn van andere virale infecties, zoals chikungunya of dengue.¹²

Er is op dit moment geen geneesmiddel of vaccin tegen ZIKV beschikbaar. Behandeling van patiënten bestaat uit symptoombestrijding.¹²

2.2 Epidemiologie

ZIKV is voor het eerst in 1947 in Oeganda geïsoleerd bij non-humane primaten. Het virus is in 1952 voor het eerst aangetroffen bij de mens.¹⁰ In 2007 en 2013 heeft ZIKV een epidemie veroorzaakt in Oceanië en Gabon (Afrika).^{11,20,21,22} In maart 2015 is voor het eerst melding gemaakt van de aanwezigheid van ZIKV in Brazilië.²³ Vóór februari 2015 kwamen gevallen van ZIKV-infecties in Brazilië niet voor. Op dit moment is er in Midden- en Zuid-Amerika een ZIKV-epidemie gaande.¹²

ZIKV is endemisch in Afrika en Azië.^{10,24} Er worden drie klonale lijnen onderscheiden: de Oost Afrikaanse, de West Afrikaanse en de Aziatische.^{2,3,4,25} Het virus dat op dit moment een epidemie veroorzaakt in Midden- en Zuid-Amerika, is verwant aan het virus dat de epidemieën in Oceanië heeft veroorzaakt, en is geëvolueerd uit de Aziatische lijn.^{3,12,24,26}

In Nederland zijn er tot nog toe 30 gevallen van ZIKV geregistreerd. Het betreft allemaal mensen die kortere of langere tijd in het buitenland zijn geweest.²⁷

2.3 Transmissie

ZIKV is een arbovirus en wordt via verschillende muggensoorten overgedragen. *Aedes aegypti* (Gele koorts mug) en *Aedes albopictus* (Aziatische tijgermug) zijn de belangrijkste transmissie-vectoren.^{20,36,37,38} Daarnaast is het aannemelijk dat *Aedes hensilli* het virus kan overdragen.^{11,41} Van veel andere muggensoorten is bekend dat zij het virus bij zich hebben, maar onbekend of ze het daadwerkelijk kunnen overbrengen.^{2,39,40,41,42} De Gele koortsmug kan zich in Nederland niet handhaven, maar wordt net als de Aziatische tijgermug incidenteel geïmporteerd in Nederland.²⁸ De Aziatische tijgermug is waarschijnlijk wel in staat om de Nederlandse winters te overleven. *Ae. hensilli* is vooralsnog nooit in Nederland aangetroffen.²⁸

ZIKV is uit semen, speeksel, bloed en urine gekweekt.^{29,30,31} Daarnaast is ZIKV-RNA met behulp van PCR in borstvoeding, in de placenta, en in vruchtwater aangetoond. Het virus-RNA is ook in het hersenweefsel van foetussen en pasgeborenen met microcefalie aangetroffen.^{13,14,16,29,32,33} Overdracht van moeder op kind tijdens de zwangerschap^{13,14,16} of rondom de bevalling³³ lijkt hierdoor hoogst waarschijnlijk.^{13,14,16} Er zijn tevens aanwijzingen dat ZIKV seksueel overdraagbaar is.^{34,35}

2.4 Reservoir

Op dit moment is het reservoir van ZIKV niet bekend. Zowel zoogdieren, waaronder de mens, apen, knaagdieren en buffels, en steekmuggen, waaronder *Aedes* en *Anopheles* soorten worden gezien als gastheer en zijn mogelijk reservoir voor het virus.^{2,10,20,36,37,38 39,40,41,42}

2.5 Classificaties ZIKV andere beoordelende instanties

België, Duitsland, Zwitserland, Canada en de VS hebben het ZIKV ingedeeld in risicogroep 2.^{43,44,45,46,47}

3. YFV

YFV behoort net als ZIKV tot het genus *Flavivirus*, familie *Flaviviridae*, en is eveneens een positief enkelstrengs RNA-virus.^{5,6} Het virus veroorzaakt gele koorts, een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika ten zuiden van de Sahara en in Zuid-Amerika. YFV kan ook worden overgebracht op mensen door de mug *Aedes aegyptii*. Symptomen van gele koorts bij de mens zijn koorts, hoofdpijn, rugpijn, misselijkheid, geelzucht en stoornissen in de nierfunctie. Daarbij kunnen ook bloedingen in de mond en in de darmen optreden. Gele koorts is een ernstige ziekte die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop heeft.⁴⁸ Een effectieve langdurige bescherming is mogelijk door vaccinatie met de verzwakte levende YFV vaccinstam YF-17D. YF-17D is afgeleid van de wildtype YFV-Asibi stam. De YF-17D stam is 75 jaar geleden ontwikkeld en er zijn miljoenen mensen mee gevaccineerd. De attenuering van YF-17D wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door een aantal mutaties in het envelop eiwit E.⁴⁹

4. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over ZIKV. Zij heeft in het verleden echter al meerdere adviezen uitgebracht over de classificatie van flavivirussen. Het betreft onder andere het *Cell fusing agent virus* (CFAV), *Dengue virus* (DENV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Tick-borne encephalitis virus*, *West Nile virus* (WNV), YFV en het *Yokose virus* (YokV). Al deze flavivirussen zijn door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.⁵⁰ De vaccinstam YF-17D, die afgeleid is van YFV heeft zij geadviseerd in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.⁵⁰

In 2009 heeft de COGEM advies uitgebracht over werkzaamheden met twee chimere flavivirussen.⁵¹ Deze chimere flavivirussen waren gebaseerd op de vaccinstam YF-17D, waarvan de structurele genen *prM* en *E* uitgewisseld werden met de overeenkomstige genen van het *Yokose virus* (YokV) en het *Cell fusing agent virus* (CFAV). Gezien de geringe hoeveelheid gegevens die bekend waren over het CFA en YokV, adviseerde de COGEM de werkzaamheden met de op YF-17D gebaseerde chimere flavivirus partikels uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Werkzaamheden met een soortgelijk chimeer flavivirus dat samengesteld is uit YF-17D en WNV, werd aanvankelijk ook op ML-III ingeschaald, maar is op basis van aanvullende wetenschappelijke gegevens omlaag geschaald naar ML-II.^{52,53}

6. Overweging

6.1 Classificatie van ZIKV

Net als bij andere flavivirusinfecties verloopt een infectie met ZIKV in het merendeel van de gevallen asymptomatisch. In het geval van een symptomatische infectie kan deze gepaard gaan met onder meer koorts, hoofdpijn en gewrichtspijn. De meeste mensen herstellen volledig. Daarnaast wordt een infectie met ZIKV ook geassocieerd met microcefalie bij de ongeboren vrucht en met GBS. Het is momenteel niet bewezen dat een ZIKV infectie als oorzaak van deze ziektebeelden aangewezen kan worden. Er komen echter steeds meer gegevens beschikbaar die een relatie tussen deze symptomen en het ZIKV bevestigen en het wordt steeds waarschijnlijker dat de huidige ZIKV stam een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van deze ziektebeelden.^{10,12-19,54} Over het algemeen geeft een ZIKV infectie dus een relatief mild ziektebeeld. De COGEM acht het evenwel waarschijnlijk dat ZIKV in een aantal gevallen een ernstig ziektebeeld kan veroorzaken.

Zover nu bekend, wordt het ZIKV hoofdzakelijk overgebracht door steekmuggen. Het betreft met name de *Aedes* soorten *Ae. aegypti* en *Ae. albopictus*. Deze vectoren worden weliswaar incidenteel 'geïmporteerd' in Nederland, maar hebben zich nog niet in Nederland gevestigd. Het ZIKV is ook in andere *Aedes* soorten aangetroffen. Het staat momenteel nog niet vast of deze het ZIKV daadwerkelijk kunnen overbrengen. Deze muggensoorten zijn nog nooit in Nederland aangetroffen. De kans lijkt hierdoor zeer klein dat ZIKV zich in het Nederlandse milieu via vectoren zal kunnen verspreiden. Gezien de transmissie via muggen is het hoogstwaarschijnlijk dat ZIKV ook via bloedtransfusie overgedragen kan worden. Met het oog op de screening van donorbloed in Nederland en de korte

periode dat ZIKV viremisch is, acht de COGEM de kans op verspreiding via deze route beperkt. Een andere transmissieroute waarvoor steeds meer aanwijzingen komen, betreft overdracht via seksueel contact. Hoewel deze transmissieroute op basis van de huidige kennis van het verspreidingspatroon waarschijnlijk minder efficiënt is dan de transmissie via vectoren, zou deze route meer dan de andere transmissieroutes aan de verspreiding van ZIKV in Nederland kunnen bijdragen. Naast de overdracht via steekmuggen is verticale transmissie van moeder op kind inmiddels algemeen geaccepteerd als transmissieroute.

Er is momenteel geen vaccin of behandeling tegen een infectie met ZIKV voorhanden.

De COGEM merkt op dat de huidige wetenschappelijke kennis over ZIKV beperkt is en omringd door vele onzekerheden. Mede vanwege de uitbraak van ZIKV in delen van Midden en Zuid-Amerika neemt deze kennis echter snel toe. Op basis van de mogelijke transmissieroutes, het mogelijke ernstige klinische beeld en de afwezigheid van een behandeling of vaccinatie, is de COGEM in het kader van het voorzichtigheidsprincipe van mening dat de classificatie van ZIKV in pathogeniteitsklasse 3 momenteel het meest passend is. Zij is zich er hierbij van bewust dat nieuwe onderzoeksgegevens, die in toenemende mate beschikbaar komen, reden kunnen geven deze classificatie te heroverwegen. De COGEM zal de ontwikkeling van de wetenschappelijke kennis over ZIKV daarom nauwlettend in de gaten houden. Indien daartoe aanleiding is, zal zij haar classificatie van ZIKV evalueren en zo nodig aanpassen.

6.2 *Inschaling van voorgenomen werkzaamheden*

Kloneringswerkzaamheden

De aanvrager is van plan om verschillende plasmideconstructen te maken en in *Escherichia coli* op te groeien. De donorsequenties betreffen individuele genen van ZIKV, cDNAs van defectieve genen en combinaties van genen waarbij de 3'en/of de 5'NTR ontbreken en replicons gedeleteerd voor structurele genen. Het betreft daarnaast ook cDNAs van volledige genen van ZIKV met daarin aangebrachte mutaties waaronder de coderende sequentie voor PrM en E van de YFV vaccinstam YF-17D, en fluorescente- en bioluminescente reporter genen.

Conform haar eerdere advies met als titel 'Inschaling van kloneringswerkzaamheden met het genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen' is de COGEM van mening dat kloneringswerkzaamheden met (delen van) het genoom van ZIKV in bacteriën uitgevoerd kan worden op ML-I inperkingsniveau.⁵⁵

In het geval van kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van ZIKV kan de COGEM niet uitsluiten dat snij en/of prikincidenten onbedoeld tot het ontstaan van infectieus virus kan leiden in de betreffende medewerker. Om deze kans op het ontstaan van infectieus virus te minimaliseren, adviseert de COGEM voor de kloneringswerkzaamheden met het volledige, al dan niet gemuteerde genoom van ZIKV de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Het gebruik van handschoenen is verplicht
- Tijdens de werkzaamheden mag geen gebruik worden gemaakt van scherpe voorwerpen of voorwerpen van glas, of andersoortige voorwerpen die wondjes in de huid kunnen veroorzaken.

Expressie van individuele genen en combinatie van genen van ZIKV

De aanvrager is van plan om de geconstrueerde plasmiden te gebruiken om verschillende virale eiwitten tot expressie te brengen in zowel animale cellen als in insectencellen. Het betreft hier de expressie van individuele genen, combinaties van genen en cDNAs van defectieve genomen met daarin eventueel aangebrachte mutaties, en fluorescente- en bioluminescente reporter genen. In alle gevallen zal het 3' en/of het 5'NTR gebied afwezig zijn. Deze gebieden zijn essentieel voor replicatie van het virale genoom en het inpakken hiervan in een virusdeeltje. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat hierdoor vermenigvuldiging van (defectieve) genoomfragmenten zal plaatsvinden of virusdeeltjes gevormd kunnen worden. Zelfs als de cellen van de onderzoeker door bijvoorbeeld een prikincident met het genoemde materiaal worden getransfecteerd, acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat dit leidt tot het ontstaan van een infectieus virus. Zij is daarom van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Op basis van de Bijlage 5 van de Regeling ggo worden genoemde werkzaamheden met sequenties van een virus behorend tot pathogeniteitsklasse 3 standaard op ML-II ingeschaald. In dit geval acht de COGEM de milieurisico's van de expressie van ZIKV genen verwaarloosbaar klein. Zij is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu ook afdoende wordt gewaarborgd als betreffende werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau worden uitgevoerd.

Productie van gg-ZIKV replicons

De aanvrager is tevens van plan om gg-ZIKV replicons te produceren in animale cellen en insectencellen. In de replicons ontbreken de structurele genen. Tevens zal de aanvrager mutaties in de replicons aanbrengen en zullen fluorescente- en/of bioluminescente reporter genen worden toegevoegd. In betreffend systeem zijn de replicons in celkweek in staat zich te vermenigvuldigen waarbij alle niet-structurele virale genen tot expressie kunnen komen. De COGEM kan niet uitsluiten dat dit ook gebeurt in cellen van een medewerker als deze door een prik- of snij-incident onbedoeld met deze replicons worden getransfecteerd. Omdat de structurele genen ontbreken, is de COGEM van mening dat hierbij geen autonoom replicerende virusdeeltjes kunnen worden gevormd. Met het oog op de huidige beperkte kennis over ZIKV kan de COGEM een mogelijk milieurisico in deze situatie echter niet uitsluiten. Zij ziet daarom geen redenen om bij deze werkzaamheden af te wijken van de inschaling die de Regeling ggo voor deze activiteiten voorschrijft.

Conform artikel 5.4.1.h. van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, adviseert de COGEM daarom deze werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Om de kans te minimaliseren dat er autonoom replicerende virusdeeltjes kunnen ontstaan door complementatie met de ontbrekende structurele genen, kan de COGEM er mee instemmen dat daar het volgende aanvullende voorschrift aan toe wordt gevoegd:

- Het te gebruiken gastheer materiaal is vrij van ZIKV en andere verwante virussen.

Productie van en infectie met gg-ZIKV

De aanvrager wil ook gg-ZIKV deeltjes produceren en onderzoeken. Daartoe worden animale cellen en insectencellen getransduceerd met cDNA van het volledige genoom van het ZIKV. In de ZIKV

genomen kunnen mutaties worden aangebracht en ook fluorescente- en/of bioluminescente reporter genen aan worden toegevoegd. Voorgenomen werkzaamheden kunnen resulteren in de productie van autonoom replicerende gg-ZIKV deeltjes. Op basis van haar inschaling van ZIKV in pathogeniteitsklasse 3 adviseert de COGEM deze werkzaamheden conform artikel 5.4.3.g op ML-III inperkingniveau in te schalen. Ondanks de op dit inperkingniveau geldende voorschriften kan een medewerker in theorie door een snij en/of prikincident onbedoeld geïnfecteerd worden door gg-ZIKV. Aangezien het vermoeden bestaat dat ZIKV ook via seksuele transmissie overgedragen kan worden, kan de COGEM hierdoor niet uitsluiten dat een onbedoeld besmette medewerker het gg-ZIKV aan derden overdraagt. Om de kans op besmetting van de medewerker door snij en/of prikincidenten te minimaliseren, adviseert de COGEM op dit inperkingsniveau derhalve het volgende aanvullende voorschrift te hanteren:

- Het gebruik van ‘sharps moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (door bijvoorbeeld het gebruik van kevlarhandschoenen)

Productie van en infectie met chimeer ZIKV-YFV virus.

Naast onderzoek aan infectieuze gg-ZIKV deeltjes die alle elementen van het ZIKV bevatten, verzoekt de onderzoeker ook te mogen werken met een chimeer ZIKV virus. Het betreft een chimeer van ZIKV en de YFV vaccinstam YF-17D. Deze chimeer is gebaseerd op het genoom van ZIKV waarin de coderende sequenties voor de PrM en E eiwitten zijn vervangen door de overeenkomstige sequenties van de vaccinstam YF-17D. De aanvrager is van mening dat de betreffende chimeer verzwakt zal zijn ten opzicht van de ZIKV uitgangsstam. Hij baseert zich hierbij onder andere op een wetenschappelijke publicatie waarin de attenuatie van YF-17D ten opzicht van YFV voor een belangrijk deel wordt gelinkt aan mutaties in het E eiwit van YF-17D.⁴⁹ Tevens stelt de aanvrager voor om de medewerkers die met betreffend chimeer zullen werken, te vaccineren met het YF-17D vaccin. Hij geeft aan dat uit de vele vaccinatiestudies met chimere flavivirussen in proefdieren en mensen blijkt dat er altijd neutraliserende antilichamen tegen het E-eiwit worden opgewekt.⁵⁶ Derhalve verwacht hij dat vaccinatie met YF-17D de medewerker bescherming zal bieden bij een onbedoelde infectie met het chimere ZIKV-YFV.

De COGEM is van mening dat chimere virussen meestal verzwakt zijn ten opzicht van de uitgangsvirussen. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat de PrM en E eiwitten een belangrijke rol spelen in het tropisme, de virulentie en in de mogelijke verspreiding van flavivirussen. Daarbij zijn de PrM en E eiwitten van YF-17D in belangrijke mate verantwoordelijk voor de waargenomen afname van de pathogeniteit en verspreiding van deze vaccinstam.^{49,57,58} De COGEM acht het daarom waarschijnlijk dat de ZIKV chimeer met de PrM en E eiwitten van het YF-17D ten opzichte van wildtype ZIKV verminderd pathogeen zal zijn, en acht de kans verwaarloosbaar klein dat deze chimeer zich in Nederland beter zal kunnen verspreiden dan het ZIKV.

Het YF-17D wordt al meer dan 10 jaar gebruikt als virale vector om vaccins te ontwikkelen tegen het JEV, WNV en DENV.⁵⁹ Aangezien het E eiwit van flavivirussen het belangrijkste aangrijpingspunt

vormt voor het humorale immuunsysteem, wordt de YF-17D vaccinstam gecombineerd met de E en PrM eiwitten van het flavivirus van interesse.⁶⁰ Over het algemeen blijken deze vaccins veilig in klinische studies en bieden ze een zekere mate van bescherming tegen het beoogde flavivirus.

De aanvrager stelt voor om de medewerker te vaccineren met YF-17D om bescherming te bieden tegen een infectie met de ZIKV-YFV chimeer die de aanvrager wil construeren. De aanvrager beargumenteert dat – mede onder in achtneming van andere aanvullende voorschriften – de preventieve vaccinatie van medewerkers met YF-17D een rechtvaardiging biedt voor omlaagschaling van de werkzaamheden.

De COGEM stelt dat YF-17D een geregistreerd vaccin is ter voorkoming van infecties met YFV. Voor zover bij haar bekend, zijn er geen studies beschreven die aantonen dat YF-17D bescherming biedt tegen een infectie met een chimeer virus samengesteld uit delen van het ZIKV en YF-17D. Het YF-17D vaccin is bovendien niet als zodanig geregistreerd. De COGEM is daarom van mening dat preventieve vaccinatie van medewerkers met YF-17D geen garantie biedt dat een medewerker beschermd is tegen een onverhoopt mogelijke besmetting met een chimeer van ZIKV-YFV. Zij kan daarom niet instemmen met de visie van de aanvrager dat preventieve vaccinatie met YF-17D omlaagschaling van de werkzaamheden rechtvaardigt.

De COGEM merkt op dat werkzaamheden met een chimeer virus dat is opgebouwd uit een pathogeniteitsklasse 2 en 3 virus, conform Bijlage 5 van de Regeling ggo standaard op ML-III inperkingsniveau ingeschaald worden. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden met gg-ZIKV-YFV in te schalen op ML-III inperkingsniveau. Om de kans op een mogelijke besmetting van medewerkers en de daaruit voortvloeiende kleine kans op verder verspreiding nog verder te minimaliseren, adviseert de COGEM tevens het volgende aanvullende voorschrift te hanteren:

- Het gebruik van ‘sharps moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (door bijvoorbeeld het gebruik van kevlarhandschoenen).

6.3 Punt van overweging voor vergunningaanvrager

Bij de werkzaamheden met autonoom replicerende gg-ZIKV deeltjes en chimere ZIKV-YFV deeltjes acht de COGEM de kans zeer klein is dat de medewerkers met de ggo's geïnfecteerd zullen worden als deze werkzaamheden worden uitgevoerd op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften. Zij wijst er echter op dat de gevolgen van een infectie voor een ongeboren kind zeer groot kunnen zijn. De COGEM wil de aanvrager daarom in overweging geven om medewerkers met een kinderwens hier goed over in te lichten en hen nadrukkelijk zelf de keuze te laten of zij werkzaamheden met deze gg-virussen willen uitvoeren. Gezien het vermoeden dat ZIKV ook via seksuele transmissie overgedragen kan worden, acht zij dit niet alleen voor vrouwen maar ook voor mannen met een kinderwens van toepassing.

7. Conclusie

De COGEM constateert dat de huidige kennis over ZIKV op dit moment nog beperkt is en omgeven wordt door vele onzekerheden over onder meer pathogeniteit en de mogelijke transmissieroutes. De aanwijzingen dat ZIKV betrokken is bij ernstige aandoeningen als microcefalie en het GBS, en deze ziektebeelden mogelijk zelfs veroorzaakt, lijken steeds sterker te worden. Gezien de huidige onduidelijkheid over de precieze eigenschappen van het ZIKV, adviseert de COGEM op basis van het voorzichtigheidsbeginsel dit virus in pathogeniteitsklasse 3 in te delen. De COGEM merkt hierbij op dat momenteel veel onderzoek wordt gedaan aan het ZIKV en de laatste paar maanden veel nieuwe gegevens over ZIKV zijn gepubliceerd. Het ligt derhalve in de lijn der verwachting dat binnen niet al te lange tijd veel meer over ZIKV bekend zal zijn. De COGEM zal deze ontwikkelingen nauwlettend in de gaten houden en indien daar aanleiding voor is haar standpunt over ZIKV heroverwegen.

Conform deze classificatie heeft de COGEM de voorgenoemde werkzaamheden in lijn met bijlage 5 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 ingeschaald. Zoals al eerder aangegeven acht zij voor kloneringswerkzaamheden van de genen van een pathogeniteitsklasse 3 virus een ML-II inperkingsniveau niet van toegevoegde waarde boven een ML-I inperkingsniveau. Ditzelfde geldt voor het tot expressie brengen van virale genen. In beide gevallen adviseert de COGEM daarom een omlaagschaling ten opzichte van de Regeling ggo.

Indien de voorgenoemde werkzaamheden op geadviseerde inperkingsniveau's en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Kuno G & Chang G-J J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152: 687-696
2. Faye O *et al.* (2013). Quantitative real-time PCR detection of *Zika virus* and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol. J.* 10: 311-319
3. Baronti C *et al.* (2014). Complete coding sequence of *Zika virus* from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announcements* 2: e00500-14
4. Berthet N *et al.* (2014). Molecular characterization of three zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector-borne Zoonotic Dis.* 14: 862-865
5. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
6. Simmonds P *et al.* (2012). Family Togaviridae. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
7. Bredenbeek PJ *et al.* (2003). A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* 84: 1261-1268
8. Hamel R *et al.* (2015). Biology of *Zika virus* infection in human skin cells. *J. Virol.* 89: 8880-8896

9. Buckley A & Gould EA (1988). Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with *Zika* or *Langkat virus*. *J. Gen. Virol.* 69: 1913-1920
10. Ioos S *et al.* (2014). Current *Zika virus* epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44: 302-307
11. Duffy MR *et al.* (2009). *Zika virus* outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360: 2536-2543
12. European Centre for Disease Prevention and Control (2016). Rapid risk assessment. *Zika virus* disease epidemic: potential association with microcephaly and Guillain–Barré syndrome. Third update, 23 February 2016. Stockholm
13. Mlakar J *et al.* (2016). *Zika virus* associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* DOI: 10.1056/NEJMoa1600651
14. Oliveira Melo OAS *et al.* (2016). *Zika virus* intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47: 6-7
15. Calvet G *et al.* (2016). Detection and sequencing of *Zika virus* from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
16. Centers for Disease Control and Prevention (2016). Notes from the field: Evidence of *Zika virus* infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65: 1-2
17. Sarno M *et al.* (2016). *Zika virus* infection and stillbirths: A case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. *PLOS Negl. Trop. Dis.* DOI:10.1371/journal.pntd.0004517
18. Oehler E *et al.* (2014). *Zika virus* infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. www.eurosurveillance.org
19. 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.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
20. Grard G *et al.* (2014). *Zika virus* in Gabon (Central Africa) - 2007: A new threat from *Aedes albopictus*? *PLOS Negl. Trop. Dis.* 8: e2681
21. Cao-Lormeau V-M *et al.* (2014). *Zika virus*, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 1085-1086
22. Musso D *et al.* (2014). Rapid spread of emerging *Zika virus* in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: O595-O596
23. Campos GS *et al.* (2015). *Zika virus* outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 1885-1886
24. Haddow *et al.* (2012). Genetic characterization of *Zika virus* strains: Geographic expansion of the Asian lineage. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 6: e1477
25. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Rapid risk assessment. *Zika virus* epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 10 December 2015. Stockholm
26. Musso D (2015). *Zika virus* transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 1887
27. RIVM (2016). *Zika virus*. www.rivm.nl/Onderwerpen/Z/Zikavirus (bezocht 01/03/2016)

28. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Aedes*. www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/search/nsr_search.php?search=Aedes (bezocht: 1 maart 2016)
29. Musso D *et al.* (2014). Potential for *Zika virus* transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. www.eurosurveillance.org
30. Musso D *et al.* (2015). Potential sexual transmission of *Zika virus*. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 359-361
31. Instituto Oswaldo Cruz (2016). Zika: potencial de infecção em saliva e urina. www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2505&sid=32 (bezocht: 1 maart 2016)
32. Musso D *et al.* (2015). Detection of *Zika virus* in saliva. *J. Clin. Virol.* 68: 53-54
33. Besnard M *et al.* (2014). Evidence of perinatal transmission of *Zika virus*, French Polynesia, December 2013 and February 2014. www.eurosurveillance.org
34. Foy BD *et al.* (2011). Probable non-vector-borne transmission of *Zika virus*, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 880-882
35. Dallas County Health and Human Services (2016). Sexual transmission of *Zika virus*. www.dallascounty.org/department/hhs/documents/DCHHS_Zika_HealthAdvisory_20160202_final.pdf
36. Li MI *et al.* (2012). Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to *Zika virus*. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 6: e1792
37. Wong P-SJ *et al.* (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A potential vector of *Zika virus* in Singapore. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 7: e2348
38. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Rapid risk assessment. Microcephaly in Brazil potentially linked to the *Zika virus* epidemic. 24 November 2015. Stockholm
39. Grard G *et al.* (2010). Genomics and evolution of *Aedes*-borne flaviviruses. *J. Gen. Virol.* 91: 87-94
40. Diallo D *et al.* (2014). *Zika virus* emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLOS ONE* 9: e109442
41. Ledermann JP *et al.* (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of chikungunya and zika viruses. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 8: e3188
42. Diagne CT *et al.* (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit *Zika virus*. *BMC Infectious Dis.* 15: 492-498
43. Het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP). Biosafety and Biotechnology Unit (SBB), Belgian Biosafety Server www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezocht: 1 maart 2016)
44. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462) (2012). www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672902/publicationFile/48593/TRBA-462.pdf (bezocht: 1 maart 2016)
45. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013. www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezocht: 1 maart 2016)
46. Government of Canada (2016). Rapid Risk Assessment: The risk of *Zika virus* to Canadians. http://healthycanadians.gc.ca/publications/diseases-conditions-maladies-affections/risks-zika-virus-risques/index-eng.php?id=publication_rapid_risk (bezocht: 1 maart 2016)

47. Centers of Disease Control and Prevention (2009). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th edition
48. Monath TP (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 1: 11-20
49. Lee E & Lobigs M (2008). E protein domain III determinants of *Yellow Fever virus* 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* 82: 6024–6033
50. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02
51. COGEM (2009). Inschaling werkzaamheden met flavivirussen CFA en YokV. COGEM advies CGM/090119-04
52. COGEM (2003). Evaluatie van een *Yellow fever virus* (YFV) recombinant met M/E geninsertie van het *West Nile virus* (WNV) in proefdieren. COGEM advies CGM/030930-04
53. COGEM (2007). Evaluatie van een recombinant Yellow Fever virus vaccine. COGEM advies CGM/070724-01
54. Tang H. *et al.* (2016). Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016> (bezoekt: 7 maart 2016)
55. COGEM (2012). Inschaling van kloneringswerkzaamheden met genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen. COGEM advies CGM/120307-01
56. Monath TP *et al.* (2015). Live virus vaccines based on yellow fever vaccine backbone: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine* 33: 62-72
57. Charlier N *et al.* (2004). Exchanging the *Yellow fever virus* envelope proteins with *Modoc virus* prM and E proteins results in a chimeric virus that is neuroinvasive in SCID mice. *J. Vir.* 78: 7418-7426
58. McElroy KL *et al.* (2008). Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct *Yellow fever virus* variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8: 675-687
59. Guy B *et al.* (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28: 632-649
60. Bonaldo MC *et al.* (2014). The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10: 1256-1265