

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 19 juli 2018
KENMERK CGM/180719-02
ONDERWERP Advies ggo-regelgeving en recombinante prionen

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Hierbij bied ik u het generieke advies getiteld 'de ggo-regelgeving als grondslag voor de risicobeoordeling van recombinante prionen' aan.

Samenvatting:

Naar aanleiding van een eerdere adviesvraag over laboratoriumwerkzaamheden met recombinante prion-eiwitten, gaat de COGEM in dit advies op de vraag in of 'recombinante' prionen al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen.

Prionen zijn 'onconventionele' infectieuze biologische agentia die overdraagbare spongieuze encephalopathieën (TSE's) veroorzaken, zeer ernstige ziekten met dodelijke afloop in mens en dier. Prionen ontstaan door misvouwing van een lichaamseigen eiwit dat vervolgens andere moleculen van datzelfde lichaamseigen eiwit aanzet tot conformatieverandering.

Het is mogelijk om infectieuze prionen (recPrP^{sc}) in laboratoria *in vitro* te produceren. Deze recPrP moleculen kunnen veranderingen in hun aminozuursequenties bevatten waardoor hun infectie-potentieel vergroot kan worden. Maatregelen om infectie van medewerkers en eventueel aanwezige dieren en om uitsleep van infectieus materiaal bij laboratoriumwerkzaamheden te voorkomen, zijn noodzakelijk.

Prionen wijken af van andere ziekteverwekkers doordat ze geen nucleïnezuur als genoom hebben. Gesteld kan worden dat de genetische informatie van PrP^{sc} gevormd wordt door de eigen eiwitstructuur. De COGEM merkt op dat er een verschil lijkt te bestaan tussen de EU richtlijnen en het Nederlandse Besluit ggo waardoor 'recombinante' prionen wel onder de EU ggo-regelgeving lijken te vallen, maar niet onder Nederlandse ggo-regelgeving.

De COGEM is van oordeel dat recombinante prionen als ggo's beschouwd moeten worden en adviseert om zo nodig het Besluit ggo aan te passen en in lijn te brengen met de betreffende EU richtlijnen.



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 IenW

De ggo-regelgeving als grondslag voor de risicobeoordeling van recombinante prionen

COGEM advies CGM/180719-02

1. Inleiding

In 2017 is de COGEM gevraagd om te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met het humane prion-eiwit (PrP).¹ De COGEM concludeerde onder meer in haar advies dat het onduidelijk was of prionen (het infectieuze agens PrP^{Sc}) die door een ggo geproduceerd worden onder de ggo-regelgeving vallen. Hoewel het een infectieus agens betreft, is het geen organisme en ontbreekt RNA of DNA als erfelijk materiaal. Alles in overweging nemende was de COGEM van oordeel dat mede vanuit het oogpunt van de waarborging van de veiligheid van mens en milieu in het laboratorium gesynthetiseerde infectieuze prionen onder de reikwijdte van de ggo-regelgeving zouden moeten vallen.

De vergunningverlenende instantie heeft het COGEM advies slechts ten dele overgenomen en was van mening dat gezuiverde prionen niet onder de ggo-regelgeving vallen omdat het eiwitten betreft. Aangezien de vergunningaanvrager voornemens was de experimenten met prionen op BSL-II niveau uit te voeren en de COGEM het vergelijkbare ML-II niveau geadviseerd had, waren de consequenties voor de waarborging van de veiligheid van het afwijken van het advies beperkt tot afwezig.

De principiële vraag of ‘recombinante’ prionen al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen, was daarmee echter nog niet beantwoord. Tijdens de bespreking van de verschillende visies is de COGEM door het ministerie van IenW uitgenodigd om haar standpunt over de status van prionen in een generiek advies toe te lichten, mede met het oog op mogelijke toekomstige vergunningaanvragen.^a

Voor de bepaling van de status van recombinante prionen in relatie tot de ggo-regelgeving zijn de volgende elementen van belang: de biologische karakteristieken van prionen, de vraag of recombinante prionen infectieus zijn, de aard en ernst van prionziekten, de wijze van overdracht van prionziekten en de kans dat deze zich kunnen verspreiden naar derden, en de juridische definities in de ggo-regelgeving en mogelijk eventuele andere regelgeving die van toepassing is.

^a De COGEM merkt op dat het onderhavige advies alleen betrekking heeft op in het laboratorium gesynthetiseerde prionen en niet op werkzaamheden met prion-besmet patiëntmateriaal, zoals weefsel of klinische ingrepen. Ook laat dit advies aggregerende eiwitten (zoals α -synucleïne, amyloid-beta en tau) die geassocieerd zijn met neurodegeneratieve ziektes, maar geen overdraagbare spongieuze encephalopathieën (TSE's) veroorzaken, buiten beschouwing.

2. Transmissible spongiform encephalopathies (TSE's)

Prionziekten, ook wel overdraagbare spongieuze encephalopathieën (*transmissible spongiform encephalopathies*; TSE's) genoemd, zijn fatale neurodegeneratieve aandoeningen die zowel bij mens als dier voorkomen en zijn een gevolg van misvouwing van het cellulaire prion-eiwit PrP^c (waarbij c staat voor cellulair).⁸

Een in het lichaam voorkomend eiwit kan alleen goed functioneren wanneer het correct gevouwen is. Niet correct gevouwen eiwitten worden door het lichaam afgebroken. Er zijn ook situaties waarin verkeerd gevouwen endogene eiwitten niet afgebroken worden en gaan aggregeren. Eerst aggregereert een beperkt aantal eiwitten (oligomere vormen), die een *seed* vormen. Hieraan kunnen zich meerdere dezelfde verkeerd gevouwen eiwitten binden, waardoor een keten en uiteindelijk een fibril (vezel) ontstaat. Van een fibril kunnen zich spontaan of door middel van cellulaire processen delen afsplitsen, die weer opnieuw als *seed* kunnen fungeren. De eiwitaggregaten zijn zeer stabiel en worden moeilijk door proteasen afgebroken.^{2,3,4} Door opeenhoping van de aggregerende eiwitten wordt het celmetabolisme verstoord en sterft de cel uiteindelijk af. Er zijn verschillende neurodegeneratieve ziekten geassocieerd met aggregatie van lichaamseigen eiwitten, echter alleen in het geval van prionen (*proteinaceous infectious particle*) is er sprake van een overdraagbare ziekte.

2.1 Het prion-eiwit

Het lichaamseigen prion-eiwit PrP^c is geconserveerd in zoogdieren en komt ook voor bij andere gewervelde dieren. Het PrP^c eiwit wordt gecodeerd door het *PRNP* gen en is een glycoproteïne dat door post-translationele modificatie met glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerd wordt aan de celmembraan.⁵ PrP^c komt in hoge concentraties voor in met name zenuwweefsel en lijkt betrokken bij een aantal essentiële processen waaronder signaaloverdracht tussen synapsen en neuriet-uitgroei.⁶

Prionen ontstaan door misvouwing van het prion-eiwit, waarbij de normale PrP^c conformatie in de abnormale pathogene isoform PrP^{sc} verandert (waarbij sc^b verwijst naar scrapie, de als eerste beschreven prionziekte).^{7,8} PrP^c is een proteïnase K gevoelige monomeer. Tijdens de conformatieverandering verandert een gedeelte van de secundaire α -helix structuur in β -sheets. De misgevouwen pathogene isoform PrP^{sc} (prion) fungeert als *template* voor nabijgelegen PrP^c-eiwitten (prion-eiwitten) die daarop in PrP^{sc} veranderen. Dit proces is zelf-propagerend. PrP^{sc} is een multimeer die veel minder gevoelig is voor proteïnase K digestie. Als gevolg hiervan zijn prionen zeer stabiel en worden ze nauwelijks afgebroken in het lichaam.⁸ Ook buiten het lichaam zijn prionen zeer stabiel. Ze zijn, mede vanwege hun hydrofobe aard, bestand tegen de meeste chemische en fysieke decontaminatiemethoden die gebruikt worden voor micro-organismen en virussen.⁹

Aggregatie van PrP^{sc} in hersenweefsel leidt tot progressieve neurodegeneratieve afwijkingen zoals motorische en cognitieve stoornissen, met de dood tot gevolg.⁸ Hoewel alle prionen het gevolg zijn

^b Naast PrP^{sc} worden ook de aanduidingen PrP^{res} (res verwijst naar resistent tegen proteïnase), PrP^{inf} (infectieus), PrP^{tsc} of de afkorting van de betreffende TSE in superscript (PrP^{BSE}, PrP^{CWD}, etc.) in de literatuur gebruikt.

van misvouwing van het PrP^c eiwit, kunnen verschillende ‘stammen’ met een eigen specifieke pathologie onderscheiden worden in één gastheer.⁴⁹ Ook prionen met identieke aminozuursequenties kunnen uiteenlopende TSE’s veroorzaken. Het verschil in eigenschappen is waarschijnlijk terug te voeren tot verschillen in de driedimensionale vorm (de ruimtelijke ofwel tertiaire structuur van een eiwit) die het PrP^{sc} molecuul aanneemt.

3. Prionziekten

Bekende vormen van TSE’s zijn Creutzfeldt-Jakob (CJD), het Gertsmann-Sträussler-Scheinker syndroom (GSS) en Kuru bij de mens, scrapie bij schapen en geiten, chronic wasting disease (CWD) bij hertachtigen en bovine spongieuze encephalopathie (ook wel BSE of gekkekoeienziekte) bij runderen.¹¹

Aan de hand van de onderliggende oorzaak van het optreden van TSE’s kunnen ze onderverdeeld worden in erfelijke, spontane (sporadische) en verworven (overdraagbare) vormen. Erfelijke TSE’s zijn hoofdzakelijk bij de mens beschreven. Spontane en verworven TSE’s komen zowel bij mens als dier voor. Overdracht van TSE’s gebeurt hoofdzakelijk oraal via besmet voedsel e.d., maar met name bij de mens komt overdracht door medische handelingen (iatrogene overdracht, via bijvoorbeeld besmette bloedproducten of chirurgische instrumenten) ook voor. Daarnaast is bij sommige prionziekten verticale overdracht niet uitgesloten en kan CWD bij hertachtigen overgedragen worden via (onderlinge) contacttransmissie. De efficiëntie van overdracht verschilt sterk tussen verschillende prionziekten. De factoren die spontane (sporadische) TSE’s veroorzaken zijn niet bekend.

Mede doordat er onvoldoende kennis is over de structuur van PrP^{sc} en de moleculaire mechanismes die leiden tot misvouwing van PrP^c en het ontstaan van ziekte, is er op dit moment geen therapie beschikbaar voor TSE’s.⁴⁹ De diagnose en bestrijding van prionziekten wordt verder ook bemoeilijkt door de ongebruikelijk lange incubatietijd van infectie met prionen. Zo is een incubatietijd van tientallen jaren geen uitzondering voor humane prionziekten.

3.1 Dierlijke prionziekten

Er zijn zeven prionziekten bij dieren bekend: scrapie, BSE, CWD, transmissible mink encephalopathy (TME), feline spongiform encephalopathy (FSE), exotic ungulate spongiform encephalopathy (EUE) en de recent ontdekte camel prion disease (CPD).

3.1.1 Scrapie

In 1732 is de eerste prionziekte bij dieren genaamd scrapie beschreven. Scrapie veroorzaakt ziekte bij schapen en geiten.^{10,18} De symptomen van scrapie zijn afwijkend gedrag, jeuk, schuren aan hekken e.d. (waaraan de ziekte zijn naam dankt), vermagering en neurologische verschijnselen, zoals trillingen van de kop en schrikgedrag.

Genetische predispositie speelt een belangrijke rol bij de ontwikkeling van scrapie bij schapen. Polymorfismes^c die leiden tot aminozuurveranderingen in codons 136 (A of V), 154 (R of H) en 171 (R, Q of H) in het *PRNP* gen zijn van invloed op het ziekteverloop. Zo zijn de genotypes VRQ/VRQ, ARQ/VRQ en ARQ/ARQ een risicofactor voor het krijgen van scrapie terwijl ARR/ARR dieren in grote mate resistent zijn.¹⁰

Scrapie kan gemakkelijk horizontaal worden overgedragen van dier-op-dier via orale transmissie en door indirecte transmissie. Bij scrapie wordt PrP^{sc} niet alleen aangetroffen in het centraal zenuwstelsel, maar ook in andere weefsels.¹⁸ Geïnfecteerde dieren scheiden infectieuze prionen uit via urine, feces, saliva en nasale secreties. Omdat prionen zeer stabiel zijn, kan dit tot langdurige besmetting van grond, weides of stallen e.d. leiden. Gedacht wordt dat besmetting van schaapskuddes met scrapie in gebieden waar deze ziekte sinds vele jaren was uitgeroeid, veroorzaakt werd door besmette gronden of weides. Scrapie kan mogelijk ook verticaal (van moeder op nageslacht) worden overgedragen.^{10,11,12}

In het verleden zijn schapen met scrapie besmet geraakt door een vaccin (tegen het door teken overgedragen *louping ill virus*) dat vervaardigd was met behulp van met formaldehyde behandelde hersenen en milt van geïnfecteerde schapen.¹³ Vaccins en farmaceutische producten vormen dus ook een potentiële besmettingsbron.

Door gericht op scrapie-ongevoeligheid te fokken bij schapen en door het instellen van een meldingsplicht voor besmette beesten, is in Nederland het aantal besmette bedrijven in de afgelopen jaren snel gedaald. Scrapie bij geiten komt in Nederland niet of bijna niet voor.

Naast klassieke scrapie is er ook een andere variant, de atypische scrapie. Atypische scrapie is onder natuurlijke omstandigheden niet besmettelijk. Bij deze variant beperkt de accumulatie van PrP^{sc} zich tot het centraal zenuwstelsel.¹⁰

3.1.2 Bovine spongieuze encephalopathie (BSE)

BSE (ook wel gekkekoeienziekte) is voor het eerst waargenomen in 1986 en is een prionziekte bij runderen. De oorsprong van BSE is niet duidelijk. Eén van de hypothesen is dat *cross-species transmission* van scrapie geresulteerd heeft in het ontstaan van BSE bij runderen. Andere hypothesen zijn dat de oorsprong van BSE het gevolg is van contaminatie van diervoer met een TSE van een andere soort (katten, geiten, exotische hoefdieren), of van spontane conversie van PrP^c in PrP^{sc}.¹⁴

BSE gevallen zijn wereldwijd gerapporteerd en het totale aantal besmette runderen tot op heden ligt rond de 200.000.¹⁵ In de jaren 90 van de vorige eeuw was er sprake van een BSE-epidemie in het Verenigd Koninkrijk. Het gebruik van vlees- en beendermeel als veevoer, dat gecontamineerd was met prionen, bleek de oorzaak van de epidemie.¹⁸ Hoewel BSE hoofdzakelijk via deze wijze wordt overgedragen zijn er ook indicaties dat verticale overdracht kan plaatsvinden.¹⁴

^c Een in een populatie veelvoorkomende (bij >1% van de individuen) mutatie in een gen.

Sinds 1994 is er een verbod in de Europese Unie (EU) op het vervoederen van vlees- en beendermeel van zoogdieren aan herkauwers om besmetting via deze route te voorkomen. In 2001 is dit verbod uitgebreid.¹⁶ Deze zogenaamde *total feed-ban* beperkt het gebruik van dierlijke eiwitten en andere producten van dierlijke oorsprong in de voeding van landbouwhuisdieren. Sindsdien zijn nog 60 gevallen van BSE bij runderen in de EU gerapporteerd.¹⁴

Naast klassieke BSE bestaat er ook een andere variant, de atypische BSE. Er wordt gedacht dat atypische BSE spontaan ontstaat en meestal oudere dieren treft. Er zijn twee varianten van atypische BSE (H- en L-BSE). Deze hebben moleculaire, pathologische en klinische kenmerken die verschillen van klassieke BSE (C-BSE).¹⁷

Voor zover bekend is BSE de enige TSE die een zoönose is.¹¹ Consumptie van BSE besmet rundvlees kan leiden tot het ontstaan van de variante vorm van CJD (vCJD) bij de mens.^{11,18} BSE kan via de voedselketen ook overgedragen worden naar andere diersoorten. Op deze wijze kan Feline spongiform encephalopathy (FSE) bij katachtigen en exotische ungulate spongiform encephalopathy (EUE) bij exotische herkauwers (elanden, grote koedoe, nyala, Arabische oryx) ontstaan.^{11,18}

3.1.3 *Transmissible mink encephalopathy (TME)*

TME is een zeldzame verworven TSE die voorkomt bij nertsen. De oorzaak van TME is onbekend. Er wordt gedacht dat met atypische BSE of scrapie besmet voedsel de bron van infectie is.^{18,19,20} Er zijn geen aanwijzingen dat TME verticaal kan worden overgedragen. TME is experimenteel overdraagbaar naar verschillende zoogdiersoorten, waaronder schapen, geiten, hamsters, stinkdieren, fretten, wasberen, marters, makaken en doodshoofdaapjes.^{19,20}

3.1.4 *Chronic wasting disease (CWD)*

De prionziekte CWD komt endemisch voor bij gedomesticeerde en wilde hertachtigen (familie: *Cervidae*) zoals herten, elanden, muntjaks en rendieren in de Verenigde Staten (VS).²³ De oorsprong van CWD is onduidelijk. Het kan het gevolg zijn van spontane conversie van PrP^c in PrP^{sc}, maar het zou ook overgedragen kunnen zijn van een andere diersoort met prionziekte (bijv. scrapie) naar hertachtigen.²³

CWD verspreidt zich geografisch gezien steeds verder. Het werd voor het eerst aangetroffen eind jaren 60 van de vorige eeuw in Colorado bij herten in gevangenschap en in 1981 bij wilde herten.²¹ In de jaren 90 is CWD gerapporteerd in omliggende gebieden in het noorden van Colorado en het zuiden van Wyoming. Sinds 2000 heeft de ziekte zich verspreid onder wilde hertachtigen in tenminste 23 staten in de VS en twee Canadese provincies. Ook is een klein aantal geïmporteerde gevallen in Zuid-Korea beschreven.²¹

In 2016 is CWD voor het eerst in Europa aangetroffen bij wilde rendieren en elanden in Noorwegen.^{22,23,24,25} In totaal zijn er 23 geïnfecteerde hertachtigen in Noorwegen gerapporteerd (19 rendieren, drie elanden en één edelhert).²⁵ De histopathologie van de besmette rendieren is

vergelijkbaar met die van CWD gevallen in Noord-Amerika. De prion-geïnfecteerde elanden en het edelhert waren oudere dieren en hadden een beperkte distributie van het prion-eiwit in het zenuwweefsel. Dit suggereert dat dit mogelijk atypische gevallen van CWD betreft die het gevolg van zijn spontane mutaties. Recent is er ook één vergelijkbaar atypisch geval in Finland gerapporteerd.²⁵

Voor de meeste prionziekten geldt dat PrP^{sc} vorming en infectiositeit voornamelijk beperkt is tot het zenuwstelsel.³² Dit is niet het geval bij CWD, waarbij PrP^{sc} aangetroffen kan worden in andere weefsels, lichaamsvloeistoffen en excreten.^{18,23,32} Dit maakt CWD tot één van de meest besmettelijke prionziekten. Geïnfecteerde dieren kunnen infectieuze prionen uitscheiden in het milieu via urine, feces, semen, melk, saliva en nasale secreties.^{11,18,23}

Overdracht vindt plaats van dier-op-dier via direct contact met een besmet dier, maar ook via indirect contact met prion-besmet voedsel, weide, water, feces, hekwerken, stallen e.d..^{11,18,23,32} De indirecte transmissie van CWD prionen bemoeilijkt de bestrijding van deze prionziekte.²³ De CWD prionen uit excreten en karkassen kunnen jarenlang persisteren in de omgeving. Wanneer prionen binden aan kleideeltjes kunnen ze zeer lang infectieus blijven. Verder zijn er ook sterke aanwijzingen voor verticale overdracht van CWD.²⁶

Resultaten van een lopende Canadese studie (Czub *et al.* *work in progress*) wijzen erop dat niet-humane primaten (makaken) geïnfecteerd kunnen raken met CWD na het eten van besmet vlees van herten of elanden.^{27,28} Een andere recente Amerikaanse studie vond daarentegen geen bewijs voor transmissie van CWD naar makaken na orale of intracerebrale inoculatie met hersenhomogenaat afkomstig van CWD-geïnfecteerde herten of elanden.²⁹ Inoculatie van muizen en hamsters leidt wel tot klinische symptomen met dodelijke afloop.³⁰

Een nieuwe studie van Barria *et al.* (2018) laat zien dat CWD PrP^{sc} (afkomstig van geïnfecteerd hersenweefsel van eland, hert of rendier) humaan PrP^c onder *in vitro* omstandigheden kan omzetten naar PrP^{sc}.³¹

Er zijn op dit moment geen aanwijzingen dat CWD naar de mens overgedragen wordt, ondanks het feit dat, onder meer door jacht op herten, mensen hoogstwaarschijnlijk al langere tijd aan CWD blootgesteld zijn. Desondanks vrezen experts dat dit mogelijk wel kan gebeuren en wordt in de VS de mogelijkheid aangeboden om geschoten dieren te testen op CWD.^{23,32,33}

3.1.5 Camel prion disease (CPD)

In 2018 is bij dromedarissen de prionziekte CPD ontdekt tijdens routinematige antemortem inspectie bij een slachthuis in het zuidoosten van Algerije.³⁴ Drie onderzochte symptomatische dieren hadden PrP^{sc} depositie en voor prionziekte kenmerkende neurodegeneratieve verschijnselen in hun hersenweefsel. Prionen zijn ook gedetecteerd in lymfoïde weefsels van één onderzocht dier. Retrospectieve analyse wijst op een prevalentie van ~3% onder de dromedarissen die in 2015-2016

naar dit slachthuis zijn gebracht. De oorsprong van CPD is onduidelijk. Biochemische karakterisatie laat zien dat PrP^{sc} van CPD verschilt van BSE en scrapie.³⁴

3.2 Humane prionziekten

Bij de mens zijn vijf prionziekten beschreven: CJD, Kuru, GSS, fatale familiale insomnie (FFI) en variabele protease-gevoelige prionopathy (VPSPr).⁴⁶ Deze prionziekten verschillen in het klinisch beeld en in welke delen van de hersenen ophoping van prionen plaatsvindt.

3.2.1 Klassieke vormen van Creutzfeldt-Jakob (CJD)

CJD is de meest bekende en vaakst voorkomende prionziekte bij de mens. Hiervan kunnen twee vormen, de klassieke en de variante vorm, onderscheiden worden. Klassieke CJD kan verder onderverdeeld worden in een spontane (sporadische), erfelijke (familiaire) en iatrogene vorm.

De spontane vorm (sCJD) komt het vaakst voor, bij ongeveer 1-1,5 gevallen per miljoen mensen per jaar (~85% van de CJD gevallen).^{35,38} De oorzaak van sCJD is onbekend, maar er wordt gedacht dat een somatische mutatie of spontane conversie van PrP^c in PrP^{sc} hieraan te grondslag ligt.^{11,38,46} Er zijn verschillende subtypes van sCJD die klinisch en histopathologisch te onderscheiden zijn. Hieraan liggen 2 typen PrP^{sc} (type 1 en type 2) en 3 genotypes van codon 129 in het *PRNP* gen ten grondslag.³⁸ Codon 129 polymorfismes (methionine (M) en valine (V)) in het *PRNP* gen zijn risicofactoren voor het ontwikkelen van prionziekte.^{38,44} Deze polymorfismes zijn ook van invloed op de incubatietijd en het klinisch fenotype van de ziekte.

De erfelijke (familiaire) vorm van CJD (fCJD) wordt veroorzaakt door mutaties in het *PRNP* gen, en betreft ~10-15% van de CJD gevallen.³⁶ Aangezien meer dan 50% van de fCJD gevallen zijn gerapporteerd in patiënten zonder een familiegeschiedenis met CJD ziektegevallen, is de term genetische CJD (gCJD) tegenwoordig een meer gangbare benaming dan fCJD.³⁷ g/fCJD is geassocieerd met verschillende mutaties in het *PRNP* gen, waaronder puntmutaties, *premature* stop codon mutaties, inserties of deleties. Net als bij sCJD speelt het M/V polymorfisme van codon 129 een belangrijke rol bij het ziekteverloop van g/fCJD.³⁷

Daarnaast zijn er meer dan 492 (ongeveer 1% van alle) gevallen bekend van iatrogene CJD (iCJD), waarbij overdracht van mens-op-mens plaatsvindt als gevolg van medisch handelen.³⁵ De meerderheid hiervan is te wijten aan de toediening van prion-gecontamineerde groeihormonen (>238 gevallen) of gonatrofine (4 gevallen), en *dura mater* transplantaties (≥238 gevallen).³⁸ Het gebruik van besmet neurochirurgisch instrumentarium en intracerebrale EEG naalden, of toediening van besmette bloedproducten kunnen ook besmettingsbronnen zijn van iCJD.³⁸ Een recente studie van Orrú *et al.* (2017) heeft in de huid van vijf overleden sCJD patiënten infectieus PrP^{sc} aangetoond. Dit roept de vraag op of iatrogene transmissie van dermale sCJD prionen een mogelijke besmettingsroute is.³⁹

3.2.2 Variante vorm van CJD (vCJD)

De variante vorm van CJD (vCJD) wordt veroorzaakt door consumptie van BSE besmet rundvlees.³⁸ Tot op heden zijn er 230 vCJD gevallen beschreven in 12 verschillende landen, waarvan de

meerderheid in het Verenigd Koninkrijk (178) en Frankrijk (27).³⁵ Er zijn daarnaast vier gevallen beschreven waarin vCJD is overgedragen van mens-op-mens via besmette bloedproducten.^{35,38,40,41}

De eerste 10 ziektegevallen van vCJD zijn gerapporteerd in 1996 in Engeland, het hoogtepunt van het aantal besmettingen lag rond de eeuwwisseling.^{35,42} De in 2001 in werking getreden *total feed ban* in de EU heeft waarschijnlijk het ontstaan van meer ziektegevallen weten te voorkomen.^{16,43}

Tot voor kort waren alle beschreven klinische gevallen van vCJD bij personen met het *PRNP* genotype 129MM.³⁵ Echter, onlangs is vCJD vastgesteld bij iemand met het genotype 129MV.⁴⁴ Dit doet de vraag rijzen of personen met 129MV of 129VV genotypes een langere asymptomatische incubatietijd hebben dan 129MM.³⁵

3.2.3 Kuru

Kuru (of Koeroe) is een verworven prionziekte. Deze ziekte werd ontdekt in de jaren 50 van de vorige eeuw bij een Papoeastam op Nieuw-Guinea en kwam voort uit ritueel kannibalisme, waarbij besmet hersenweefsel van overleden familieleden werd geconsumeerd.⁴⁵ In sommige gevallen is een incubatietijd van meer dan 50 jaar gerapporteerd.⁴⁵ Voor Kuru geldt dat individuen met alle drie de *PRNP* genotypes 129MM, 129VV en 129MV geïnfecteerd kunnen raken, maar dat er een langere incubatietijd is bij individuen met genotype 129MV.³⁵

3.2.4 GSS, FFI, sFI en VPSPr

GSS en FFI zijn erfelijke prionziekten die optreden als gevolg van mutaties in het *PRNP* gen.^{38,46} GSS is geassocieerd met veel verschillende puntmutaties, waaronder in codons 102, 105, 117 en Y145 van het *PRNP* gen. Deze mutaties leiden tot verschillende klinische en histopathologische fenotypes.^{37,38} De meest voorkomende oorzaak van GSS is een P102L mutatie.³⁷ FFI is geassocieerd met een D178N mutatie gekoppeld aan het M129 polymorfisme.⁴⁶ Van FFI bestaat ook een sporadische vorm (sFI) met dezelfde klinische symptomen als FFI, maar zonder onderliggende mutaties in *PRNP*.^{38,46} Een andere sporadische vorm van prionziekte is VPSPr, welke geassocieerd is met codon 129 genotypes (129MM, 129MV en 129VV) in het *PRNP* gen.^{38,46,47}

4. Experimenteel onderzoek naar ‘recombinante’ prionen en overdracht TSE’s

Er bestaan verschillende (transgene) diermodellen en cellijnen waarmee TSE’s bestudeerd kunnen worden. Sinds 1997 is het ook mogelijk om in *Escherichia coli* (grote hoeveelheden) recombinant PrP (recPrP) te produceren.^{48,49} Hierdoor kan onderzoek naar TSE’s in *in vitro* systemen plaatsvinden en kan transmissie van TSE’s beter onderzocht worden.

4.1 Productie van ‘recombinante’ prionen en infectiositeit in diermodellen

Geproduceerd recPrP kan met de *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA) techniek omgezet worden in recPrP^{sc}.^{50,51} Hierbij worden in de eerste PMCA cyclus prionen, gezuiverd uit hersenweefsel, toegevoegd aan het recPrP^c. De gezuiverde prionen dienen als *seed* voor de omzetting van het recPrP^c in recPrP^{sc}. Verscheidene studies onderstrepen het belang van de aanwezigheid van co-

factoren zoals fosfolipiden en polyanionen bij de totstandkoming van infectieuze recombinante prionen, hoewel ook gerapporteerd is dat (een lage) infectiositeit bereikt kan worden in de aanwezigheid van alleen SDS.^{50,52,53,54,55,56,57}

Het blijkt ook mogelijk om recPrP *in vitro* fibrillen te laten vormen.^{57,58,59} Voor de *in vitro* vorming van fibrillen moet het recPrP behandeld worden met denaturerende agentia zodat het eiwit ontvouwt. De fysisch chemische eigenschappen van de gevormde fibrillen zijn mede afhankelijk van de reactiecondities in de daarop volgende incubatiestap (*annealing*), zoals de pH en concentratie van het gebruikte chaotrope reagens. Mutaties en deleties in de recPrP sequentie kunnen de efficiëntie van omzetting beïnvloeden.⁶⁰ In een PMCA test is aangetoond dat deze recPrP fibrillen als *seed* kunnen functioneren om uit hersenen gezuiverd PrP^c om te zetten in PrP^{sc}.⁶¹

In vitro gegenereerde fibrillen zijn infectieus in diermodellen, hoewel de infectiositeit laag en soms afwezig is, dit is afhankelijk van het recPrP en het diermodel.^{59,58} Daarnaast is de ontwikkeling van ziektesymptomen vertraagd. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een andere misvouwing en daardoor afwijkende tertiaire structuur van het recPrP^{sc}.⁶² Recent toonde Choi *et al.* (2016) aan dat getrunceerd N-terminaal recPrP omgezet naar fibrillen, in afwezigheid van co-factoren (zoals fosfolipiden of polyanionen), infectieus is in zowel wildtype als genetisch gemodificeerde (gg-) muizen.⁵⁸ Opvallend genoeg, vertoonden alle geïnoculeerde muizen klinische symptomen. Na inoculatie konden in de hersenen van de muizen zowel korte fragmenten (GSS-achtige), als volledig (scrapie-achtige) PrP^{sc} worden aangetoond.

Een recente studie van Kim *et al.* (2018) laat voor het eerst zien dat infectieuze humane prionen *in vitro* gegenereerd kunnen worden, door in *E. coli* tot expressie gebracht humaan prion-eiwit te *seeden* met uit hersenweefsel gezuiverde sCJD prionen in aanwezigheid van de cofactor ganglioside GM1.⁶³

4.2 Overdracht TSE's in experimentele diermodellen

Onder experimentele omstandigheden kunnen TSE's overgedragen worden via injectie met prionen of met besmet weefsel, zoals hersen- en zenuwweefsel. Intercerebrale injectie lijkt de meest efficiënte manier van inoculatie. Terwijl overdracht van TSE's tussen individuen binnen een soort over het algemeen efficiënt verloopt, is overdracht tussen verschillende species over het algemeen lastiger te bewerkstelligen. De efficiëntie van overdracht is laag en ook de ontwikkeling van het ziektebeeld verloopt trager dan normaal. Dit wordt aangeduid met 'species-barrière'. Door herhaaldelijke passage in de nieuwe diersoort kan deze doorbroken worden. De oorzaak van de species-barrière is nog onbekend. Deels lijken verschillen in de sequenties van de *PRNP* genen een rol te spelen, maar ook indien er geen sequentieverschillen zijn, kan de species-barrière aanwezig zijn. Verondersteld wordt dat verschillen in de tertiaire conformatie van PrP-eiwitten tussen diersoorten een rol spelen.

5. Eerder COGEM advies

In 2017 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van klonerings- en productiewerkzaamheden in *E. coli* met een getrunceerde versie van humaan PrP^c bestaande uit aminozuren 90-231 (rPrP⁹⁰⁻²³¹).¹

Deze variant omvat PrP27-30, de proteïnase K-resistente kern van PrP^{sc}. PrP27-30 ontstaat uit PrP^{sc} door klieving van de N-terminus in de buurt van aminozuur residu 90. Tijdens de werkzaamheden zou er mogelijk infectieus PrP^{sc} gevormd kunnen worden. Na de productie in *E. coli* was de aanvrager voornemens om het recombinante prion-eiwit (recPrP⁹⁰⁻²³¹) op te zuiveren, waarbij de *E. coli* afgedood zou worden.

In haar advies merkte de COGEM op dat het duidelijk is dat klonerings- en expressiewerkzaamheden met humane prion-eiwitten in *E. coli* onder de ggo-regelgeving vallen. Echter, of werkzaamheden met het opgezuiverde prion-eiwit na afdoding van de *E. coli* al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen, was volgens haar niet evident. Mede door deze onzekerheid werd de COGEM daarom voor een uitdaging gesteld om in de korte termijn (14 dagen) die ter beschikking stond, over bovengenoemde vergunningaanvraag voor Ingeperkt Gebruik te adviseren. De COGEM heeft hierbij een pragmatische aanpak gehanteerd en in haar advies 'veiligheid voor mens en milieu' centraal gesteld. Zij heeft daarom ook de zuivering van het geproduceerde prion-eiwit in ogenschouw genomen, ondanks dat zij alleen gevraagd was te adviseren over de klonerings- en expressiewerkzaamheden met het humane prion-eiwit in *E. coli*. Zij heeft meegewogen dat het prion-eiwit een onconventioneel biologisch agens is met een infectieus karakter.

De COGEM was van oordeel dat de klonerings- en expressiewerkzaamheden met het humane prion-eiwit in *E. coli* op ML-I uitgevoerd konden worden omdat de kans op vorming van infectieuze prionen verwaarloosbaar klein was. De COGEM adviseerde daarnaast om de zuivering van de prion-eiwitten op ML-II uit te voeren, omdat zij op grond van de toen beschikbare gegevens niet kon uitsluiten dat prionen gevormd kunnen worden tijdens de zuivering. Hierbij adviseerde de COGEM een aantal maatregelen ter bescherming van de medewerker.¹

6. Wet- en regelgeving met betrekking tot (recombinante) prionen en TSE's

Gezien de mogelijke risico's die aan TSE's verbonden zijn, is er voor verschillende aandachtsgebieden regelgeving in de EU en Nederland van kracht waarin TSE's specifiek genoemd worden. Voor laboratoriumwerkzaamheden met onconventionele agentia die in verband worden gebracht met humane TSE's, BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's is de Arbo-regelgeving van kracht.

BSE en scrapie staan vermeld op de lijst met meldingsplichtige dierziekten van de *World Organisation for Animal Health* (OIE).⁶⁴ De door de OIE vastgestelde normen en richtlijnen vormen mede het kader voor EU-beleid betreffende de diergezondheid. De EU Verordening 999/2001 (geïmplementeerd in Nederlandse regelgeving door middel van de Regeling preventie, bestrijding en monitoring van besmettelijke dierziekten en zoönosen en TSE's) is gericht op de preventie, bestrijding en uitroeiing van overdraagbare TSE's bij dieren, onder meer door regels voor monitoring, inspectie, beheersmaatregelen e.d. van mogelijk besmette dieren voor te schrijven.⁶⁵ Voor laboratoriumwerkzaamheden met veroorzakers van dierlijke TSE's is de EU Verordening 2016/429 van toepassing.^{66,67,68}

Verder heeft de *World Health Organization* (WHO) verschillende richtsnoeren opgesteld ter beheersing van TSE's.^{69,70} Deze zijn voor het onderwerp van dit advies echter minder van belang.

6.1 Arbo-regelgeving

In de Richtlijn 2000/54/EG betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op werk, worden onconventionele agentia die in verband worden gebracht met TSE's (zijnde CJD, vCJD, GSS, Kuru, BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's) in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld.⁶⁶ Daarbij wordt opgemerkt dat deze biologische agentia voor de werknemers een beperkt besmettingsrisico kunnen vormen, omdat ze normaal niet aërogeen overdraagbaar zijn en dat in bijzondere gevallen van bepaalde veiligheidsmaatregelen kan worden afgezien. Ook staat er genoteerd dat er geen aanwijzingen zijn voor infecties bij de mens door de agentia die verantwoordelijk zijn voor dierlijke TSE's anders dan BSE. Niettemin wordt beheersingsniveau 3 aanbevolen als veiligheidsmaatregel voor laboratoriumwerkzaamheden. Voor laboratoriumwerkzaamheden met betrekking tot een geïdentificeerde scrapieverwekker, is beheersingsniveau 2 als voldoende aangemerkt. Deze richtlijn is omgezet in Nederlandse regelgeving in hoofdstuk 4, afdeling 9 Biologische agentia, van het Arbobesluit.⁶⁷

6.2 Onderzoek TSE's bij dieren

EU Verordening 2016/429 stelt dat laboratoria die met het oog op onderzoek, onderwijs, diagnostiek, of de productie van vaccins en andere biologische producten, werken met ziekteverwekkers, maatregelen moeten nemen inzake biobeveiliging, bioveiligheid en biologische inperking om te voorkomen dat de ziekteverwekkers ontsnappen en verspreiden naar dieren buiten het laboratorium. In de Regeling Erkenning en aanwijzing veterinaire laboratoria (paragraaf 6 Aanwijzing laboratoria, Artikel 19) is vastgelegd dat Wageningen Bioveterinary Research (te Lelystad) het referentielaboratorium is in Nederland voor diagnostiek naar dierlijke TSE's.

6.3 Genetisch gemodificeerde organismen (ggo's)

De regelgeving op het gebied van genetische gemodificeerde organismen is vastgelegd in verschillende EU richtlijnen en verordeningen. De ggo-regelgeving beoogt de veiligheid van mens en milieu te waarborgen. Dit betekent dat voor alle werkzaamheden met ggo's een risicobeoordeling moet plaatsvinden. Of werkzaamheden met de agentia die in verband worden gebracht met TSE's onder de ggo-regelgeving vallen, hangt mede af van de gehanteerde juridische definities.

EU Richtlijn 2009/41/EG is van toepassing op werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen in laboratoria en diervverblijven e.d., het zogenaamde ingeperkt gebruik.⁷¹ Hierbij wordt een 'micro-organisme' gedefinieerd als: *“elke cellulaire of niet-cellulaire microbiologische entiteit met het vermogen tot replicatie of tot overbrenging van genetisch materiaal, met inbegrip van virussen, viroïden en dierlijke en plantencellen in cultuur”* en een 'genetisch gemodificeerd micro-organisme' (GGM) als: *“een micro-organisme waarvan het genetische materiaal veranderd is op een wijze die van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinatie niet plaatsvindt”*.

De verschillende EU richtlijnen en verordeningen zijn in Nederland geïmplementeerd door middel van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (Besluit ggo). In het Besluit ggo worden dezelfde definities van (micro-)organisme en ggo gehanteerd als in de EU richtlijnen.^{71,72} Echter in artikel 1.5 wordt genetische materiaal gedefinieerd door “*genetisch materiaal: desoxyribonucleïnezuur (DNA) en ribonucleïnezuur (RNA)*”. Hoewel in de richtlijnen op verschillende plaatsen sprake is van nucleïnezuren of recombinant nucleïnezuren, wordt nergens expliciet vermeld dat genetisch materiaal beperkt is tot DNA of RNA. Hiermee lijkt de Nederlandse regelgeving een beperktere reikwijdte te hebben dan de EU regelgeving.

7. Inschaling TSE veroorzakende agentia door buitenlandse instanties

In België en de meeste andere EU-lidstaten vallen laboratoriumwerkzaamheden met de agentia die in verband worden gebracht met TSE's onder de Arbo-regelgeving en de ggo-regelgeving.⁷³ Het Belgische Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) heeft onconventionele agentia die geassocieerd zijn met de TSE's BSE, CWD, CJD, GSS, Kuru, scrapie, TME en vCJD in risicogroep 3 ingedeeld. Met daarbij de opmerking dat deze onconventionele agentia een beperkt infectierisico vormen voor mensen en dieren, omdat ze normaal niet infectieus zijn via aërogene overdracht.⁷⁴

Het Zwitserse *Federal Office for the Environment* (FOEN) deelt 'onconventionele agentia' die in verband worden gebracht met de TSE's CJD, BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's, GSS en Kuru in risicogroep 3 in. De TSE's die niet geassocieerd zijn met ziekte in mens en alleen ziekte in dieren veroorzaken, zoals scrapie en CWD worden in risicogroep 2 ingedeeld.⁷⁵ Het '*Swiss Expert Committee for Biosafety*' (SECB) heeft expressiewerkzaamheden met PrP^c ingedeeld in klasse 1, en activiteiten met PrP^{sc}, afhankelijk van de aard van de werkzaamheden, in klasse 2 of 3.⁷⁶

8. Overweging en advies

TSE's zijn ernstige ziekten met dodelijke afloop in mens en dier. De veroorzakers van TSE's, prionen, zijn 'onconventionele' biologische agentia die overgedragen kunnen worden tussen individuen van dezelfde soort en soms naar andere soorten, waarbij de mate en efficiëntie van overdracht afhankelijk is van de omstandigheden en het prion. Prionen zijn zeer stabiel en kunnen gedurende lange tijd infectieus in het milieu aanwezig blijven. Eén van de TSE's is een zoönose. In deze opzichten verschillen de eigenschappen van prionen niet van andere pathogenen.

Het verschil is dat andere infectieuze agentia de genetische informatie nodig voor hun reproductie bij zich dragen in de vorm van nucleïnezuren (DNA of RNA), terwijl prionen geen nucleïnezuren bevatten. Het *PRNP* gen codeert het lichaamseigen PrP^c eiwit dat essentiële functies in de cel vervult. Pas nadat de conformatie van het eiwit verandert, ontstaat het infectieuze agens PrP^{sc} dat zich vermenigvuldigt door andere PrP^c moleculen aan te zetten tot conformatieverandering naar PrP^{sc}. Hierdoor kan gesteld kan worden dat de genetische informatie van PrP^{sc} gevormd wordt door de PrP^{sc} eiwitstructuur.

Het is mogelijk om infectieuze prionen of prion-achtige structuren in laboratoria *in vitro* te produceren. Deze recPrP moleculen kunnen mutaties en deleties in hun aminozuursequenties bevatten waardoor hun infectie-potentieel vergroot kan worden. Maatregelen bij werkzaamheden in laboratoria en diervverblijven e.d. om infectie van medewerkers en eventueel aanwezige dieren en om uitsleep van infectieus materiaal te voorkomen is daardoor noodzakelijk.

Bij ggo-werkzaamheden met pathogenen is normaal gesproken de ggo-regelgeving van kracht om de veiligheid voor mens en milieu te garanderen. Prionen lijken te voldoen aan de juridische definitie in de ggo-regelgeving van een micro-organisme *“elke cellulaire of niet-cellulaire microbiologische entiteit met het vermogen tot replicatie of tot overbrenging van genetisch materiaal, met inbegrip van virussen, viroïden en dierlijke en plantencellen in cultuur”*. Prionen zijn een biologische entiteit met vermogen tot replicatie. Wetenschappelijk gezien zijn het geen organismen, maar in dat opzicht zijn prionen vergelijkbaar met virussen en viroïden, die juridisch gezien ook onder de definitie van een organisme vallen. Parallellen zijn te trekken met de in de definitie genoemde viroïden, dit zijn kleine circulaire RNA moleculen die niet coderen voor een eiwit en door de gastheercel gerepliceerd worden.

In het laboratorium geproduceerd infectieus recPrP^{sc} lijkt ook te voldoen aan de juridische definitie van een ggo *“een micro-organisme waarvan het genetische materiaal veranderd is op een wijze die van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinatie niet plaatsvindt”*.

Gezien de aard en ernst van de ziekten die prionen veroorzaken, het feit dat ze overdraagbaar kunnen zijn, de noodzaak om maatregelen ter bescherming van mens en milieu te nemen en de gehanteerde definities betreffende micro-organisme en ggo in de EU Richtlijnen, lijkt het evident dat prionen onder de reikwijdte van de ggo-regelgeving vallen. Echter de Nederlandse ggo-regelgeving wijkt af van de EU Richtlijnen doordat een definitie van genetisch materiaal, zijnde DNA of RNA in het Besluit ggo is opgenomen. Hiermee lijkt de reikwijdte van de Nederlandse regelgeving - mogelijk onbedoeld - beperkter dan die van de EU regelgeving.

Laboratoriumwerkzaamheden met recPrP brengen risico's voor zowel medewerkers als voor het milieu met zich mee. Verschillende regelgevingen zijn van kracht met betrekking tot TSE's, maar lijken niet alle typen van werkzaamheden af te dekken. Er zijn regels en richtlijnen voor bestrijding van dierlijke TSE's, voorkoming van besmetting van vaccins en farmaceutica, omgang met besmet patiëntmateriaal en klinische ingrepen bij patiënten. Ook voor diagnostische laboratoria zijn strikte regels opgesteld. Echter voor onderzoek naar TSE's in laboratoria lijkt alleen de Arbo-regelgeving van kracht. Werkzaamheden met agentia die in verband worden gebracht met humane TSE's, BSE en daaraan verwante dierlijke TSE's vallen onder het Arbo-besluit. Bescherming van medewerkers voorkomt ook dat overdracht naar derden vanuit de medewerker zal plaatsvinden. Arbo-regelgeving is gericht op bescherming van de medewerker en niet het milieu. Onderzoek naar dierlijke TSE's die niet naar de mens overgedragen kunnen worden, valt niet onder Arbo-regelgeving. Ook een deel van de werkzaamheden met recPrP^{sc} zal in strikt juridische zin niet onder de Arbo-regelgeving vallen.

Opgemerkt moet worden dat onderzoekers in Nederland zich goed bewust lijken te zijn van de mogelijke risico's verbonden aan werkzaamheden met agentia die in verband worden gebracht met TSE's en veiligheidsmaatregelen in acht nemen. Dit neemt niet weg dat een juridische basis voor het hanteren van veiligheidsmaatregelen voor bepaalde experimenten lijkt te ontbreken.

Alles overwegende is de COGEM is van oordeel dat recombinante prionen (recPrP^{sc}) als genetisch gemodificeerde organismen beschouwd moeten worden. De COGEM adviseert – mede met het oog op mogelijk toekomstige ontwikkelingen – om het Besluit ggo aan te passen en in lijn te brengen met de betreffende EU richtlijnen door de definitie van genetisch materiaal te schrappen.

Referenties

1. COGEM (2017). Inschaling *in vitro* werkzaamheden met recombinant humaan prion-eiwit. COGEM advies CGM/170825-01
2. Jucker M & Walker LC (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501: 45-51
3. Morales R *et al.* (2015). Prion-like features of misfolded A-beta and tau aggregates. *Virus Res.* 207: 106-112
4. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit tau. CGM/161018-01
5. Watts JC *et al.* (2018). The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 135: 159-178
6. Amin L *et al.* (2016). Characterization of prion protein function by focal neurite stimulation. *J. Cell. Sci.* 129: 3878-38913891
7. Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136–144.
8. Prusiner SB (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13363-13383
9. Ridgway G (2008). ESAC-Pr New technologies working group report on prion inactivating agents. Department of Health, UK.
10. EFSA (2014). Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. *EFSA Journal* 12: 3781
11. Mabbott NA (2017). How do PrPSc Prions Spread between Host Species, and within Hosts? *Pathogens.* 6, 60. doi: 10.3390/pathogens6040060
12. EFSA Panel on Biological Hazards (2013). Scientific Opinion on the risk of transmission of classical scrapie via *in vivo* derived embryo transfer in ovine animals. *EFSA Journal* 11(2): 3080 -3090. doi:10.2903/j.efsa.2013.3080
13. Gordon WS (1946) Advances in veterinary research. Louping-ill, tick-borne fever, and scrapie. *Vet. Rec.* 58: 516-525
14. EFSA (2017). Bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases born after the total feed ban. *EFSA Journal* 15: 4885
15. World Organisation for Animal Health (OIE). BSE situation in the world and annual incidence rate. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/> (bezoekt: 23 februari 2018)
16. Verordening (EG) Nr. 999/2001 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 22 mei 2001 houdende vaststelling van voorschriften inzake preventie, bestrijding en uitroeiing van bepaalde overdraagbare spongiforme encefalopathieën <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=CELEX:32001R0999> (bezoekt: 16 februari 2018)
17. EFSA (2014). Atypical BSE study protocol. *EFSA Journal* 12: 3798
18. Imran M & Mahmood S. An overview of animal prion diseases. *Virol. J.* 8:493
19. Liberski PP *et al.* (2009). Transmissible mink encephalopathy - review of the etiology of a rare prion disease. *Folia. Neuropathol.* 47: 195-204
20. Iowa State University (2016) Factsheet Transmissible Mink Encephalopathy. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/transmissible_mink_encephalopathy.pdf (bezoekt: 4 juli 2018)

- 21 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CWD. Occurrence. <https://www.cdc.gov/prions/cwd/occurrence.html> (bezocht: 4 juli 2018)
22. Benestad SL *et al.* (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Veterinary Research*, 47, 88. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4>
23. EFSA (2017). Scientific Opinion on chronic wasting disease (CWD) in cervids. *EFSA Journal* 15:4667
24. EFSA (2017). The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2016. *EFSA Journal* 15:5069
25. Department for Environment, Food and Rural Affairs Animal & Plant Health Agency Veterinary & Science Policy Advice Team - International Disease Monitoring (2018). Update on Chronic Wasting Disease in Europe. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/703368/sa-cwd-norway-20180425.pdf (bezocht: 4 juli 2018)
26. Nalls AV *et al.* (2013) Mother to offspring transmission of Chronic Wasting Disease in Reeves' Muntjac Deer. *PLoS ONE* 8(8): e71844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071844>
27. PRION 2017. Conference talk. First evidence of intracranial and peroral transmission of Chronic Wasting Disease (CWD) into *Cynomolgus* macaques: a work in progress. <https://www.youtube.com/embed/Vtt1kAVDhDQ> (bezocht: 7 februari 2018)
28. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) (2017). CWD – update statement. Opinion of the Panel on Biological Hazards of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. <https://vkm.no/download/18.25950e0715e84a118a6ec492/1506925175221/Statement%20CWD.pdf> (bezocht: 12 februari 2018)
29. Race B *et al.* (2018). Lack of Transmission of Chronic Wasting Disease to *Cynomolgus* Macaques. *J. Virol.* doi: 10.1128/JVI.00550-18
30. Herbst A *et al.* (2017). Chronic wasting disease prion strain emergence and host range expansion. *Emerg. Infect. Dis.* 23(9):1598-1600. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2309.161474>
- 31 Barria MA *et al.* (2018). Susceptibility of Human Prion Protein to Conversion by Chronic Wasting Disease Prions. *Emerg. Infect. Dis.* 24: 1482-1489
32. Hannaoui S *et al.* (2017). Chronic wasting disease: Emerging prions and their potential risk. *PLoS Pathog.* 13: e1006619. doi: 10.1371/journal.ppat.1006619.
33. Waddell L *et al.* (2018). Current evidence on the transmissibility of chronic wasting disease prions to humans-A systematic review. *Transbound Emerg. Dis.* 65: 37-49
34. Babelhadj B *et al.* (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 24: 1029-1036
35. Seed CR *et al.* (2018). Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion safety. *Vox. Sang.* doi: 10.1111/vox.12631
36. Sitammagari KK & Masood W (2018). Creutzfeldt Jakob Disease. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-. 2018 Jun 19.
37. Schmitz M *et al.* (2017). Hereditary Human Prion Diseases: an Update. *Mol. Neurobiol.* 54: 4138-4149
38. Bonda DJ *et al.* (2016). Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg. Focus* 41: E10. doi: 10.3171/2016.5.FOCUS15126

39. Orrú CD *et al.* (2017). Prion seeding activity and infectivity in skin samples from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci. Transl. Med.* 9
40. Davidson LR *et al.* (2014). Variant CJD and blood transfusion: are there additional cases? *Vox. Sang.* 107: 220-225
41. World Health Organization (2006). WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies.
<http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf?ua=1> (bezocht: 5 juli 2018).
42. Will RG *et al.* (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* 347(9006):921-925
43. Collee JG *et al.* (2006). Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. *Folia Neuropathol.* 44: 102-110
44. Mok T *et al.* (2017). Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *N. Engl. J. Med.* 376: 292-294
45. Collinge J *et al.* (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet.* 367: 2068-2074
46. Imran M & Mahmood S (2011). An overview of human prion diseases. *Viol. J.* 8:559
47. Zou WQ *et al.* (2010) Variably Protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol.* 68(2): 162–172. doi: 10.1002/ana.22094
48. Hornemann S *et al.* (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* 413: 277-281
49. Charco JM *et al.* (2017). Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Pathogens.* 6: 67 doi: 10.3390/pathogens6040067.
50. Wang F *et al.* (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327: 1132–1135.
51. Deleault RN *et al.* (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (23) 9741-9746; DOI: 10.1073/pnas.0702662104
52. Wang F *et al.* (2012) Genetic informational RNA is not required for recombinant prion infectivity. *J. Virol.* 86: 1874–1876
53. Deleault NR *et al.* (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 8546-8551
54. Deleault NR *et al.* (2012). Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: E1938-1946
55. Zhang Z *et al.* (2013). *De novo* generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. *FASEB J.* 27: 4768-4775
56. Supattapone S (2014). Synthesis of high titer infectious prions with cofactor molecules. *J. Biol. Chem.* 289: 19850-19854
57. Kim JL *et al.* (2010). Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J. Biol. Chem.* 285: 14083-14087
58. Choi J-K *et al.* (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: 13851-13856

59. Makarava N *et al.* (2010) Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol.* 119: 177–187
60. Vanik DL *et al.* (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol. Cell* 14: 139-145
61. Moda F *et al.* (2015). Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathog* 11(12): e1005354. doi:10.1371/journal.ppat.1005354
62. Timmes AG *et al.* (2013). Recombinant prion protein refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks *in vivo* infectivity. *PLoS One.* 8: e71081. doi: 10.1371/journal.pone.0071081
63. Kim C *et al.* (2018). Artificial strain of human prions created *in vitro*. *Nat. Commun.* 9: 2166
64. World Organisation for Animal Health (OIE; 2018). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/> (bezoekt: 23 februari 2018)
65. Verordening (EG) Nr. 270/2002 van de Commissie van 14 februari 2002 tot wijziging van Verordening (EG) nr. 999/2001 van het Europees Parlement en de Raad wat betreft gespecificeerd risicomateriaal en epizoötiëbewaking ten aanzien van overdraagbare spongiforme encefalopathieën en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1326/2001 wat betreft diervoeding en het in de handel brengen van schapen en geiten en producten daarvan
66. Richtlijn 2000/54/EG van het Europees Parlement en de Raad van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk
67. Arbeidsomstandighedenbesluit. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0008498/2018-05-01> (bezoekt: 11 juni 2018)
68. Verordening (EU) 2016/429 van het Europees parlement en de Raad van 9 maart 2016 betreffende overdraagbare dierziekten en tot wijziging en intrekking van bepaalde handelingen op het gebied van diergezondheid („diergezondheidswetgeving”)
69. World Health Organization (2000). WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies. http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/WHO_CDS_CSR_APH_2000_3/en/ (bezoekt: 5 juli 2018)
70. World Health Organization (2003). WHO guidelines on transmissible spongiform encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical products. <http://www.who.int/biologicals/publications/en/whotse2003.pdf> (bezoekt: 5 juli 2018)
71. Richtlijn 2009/41/EG van het Europees parlement en de Raad van 6 mei 2009 inzake het ingeperkte gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen
72. Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad
73. Leunda A *et al.* (2013) Laboratory activities involving transmissible spongiform encephalopathy causing agents. *Prion* 7: 420–433

74. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_virus.pdf (bezocht: 8 juni 2018).
75. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013 <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 5 juli 2028)
76. Swiss Expert Committee for Biosafety (SECB) (2013). Recommendation of the Swiss Expert Committee for Biosafety on the classification of activities using prion genes and prion proteins. https://www.efbs.admin.ch/inhalte/dokumentation/empfehlungen/Empfehlungen_aktuell/Prionen_EFBS_E.pdf (bezocht: 5 juli 2018)