

De minister van Volkshuisvesting  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

DATUM 19 januari 2009  
KENMERK CGM/090119-04  
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met flavivirussen CFA en YokV

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van ontwerpbeschikking IG-07-127 betreffende de “*De moleculaire biologie en het gastheer tropisme van non-arbo flavivirussen*” van het Academisch Ziekenhuis Leiden, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van een onderzoek naar de moleculaire biologie en het gastheer tropisme van enkele flavivirussen. De aanvrager heeft reeds een vergunning voor werkzaamheden met een aantal gespecificeerde zogenaamde non-known vector (NKV) virussen en verzoekt nu twee NKV virussen toe te voegen aan deze vergunning, te weten het *Cell fusing agent* (CFA) en het *Yokose virus* (YokV).

Het genus *Flaviviridae* omvat ruim tachtig virussen waarvan een groot aantal geassocieerd wordt met humane ziekten. Infecties met flavivirussen worden eveneens aangetroffen in gedomesticeerde dieren (o.a. kalkoen, varken, schaap en hond) en wilde dieren (o.a. ratten en vleermuizen). De meeste flavivirussen zijn ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3.

Over beide virussen die de aanvrager wil toevoegen aan de vergunning zijn weinig gegevens bekend. CFA is geïsoleerd uit een insectencelijn en YokV is geïsoleerd uit een vleermuis. Van het CFA virus zijn geen andere isolaten bekend en het virus is nooit bij andere organismen aangetoond. Infectie met YokV is alleen bij enkele soorten vleermuizen aangetoond, maar nooit bij mensen of andere dieren.

Gezien de geringe hoeveelheid literatuur over de herkomst, overdracht en verspreiding van deze virussen en de verwantschap van deze virussen met enkele ernstige humane en dierlijke pathogenen in het genus *Flaviviridae*, kan de COGEM instemmen met het voorstel de voorgenomen werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde NKV virussen CFA en YokV in te schalen op inperkingsniveau ML-III. De COGEM is van mening dat met het hanteren van de geldende voorschriften voor dit inperkingsniveau 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

cc. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

# Inschaling werkzaamheden met flavivirussen CFA en YokV

## COGEM advies CGM/090119-04

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende de moleculaire biologie en het gastheer tropisme van enkele *flavivirussen*. De aanvrager, het Academisch Ziekenhuis Leiden, vraagt een wijziging van vergunning IG 07-127/01 met de titel “*De moleculaire biologie en het gastheer tropisme van non-arbo flavivirussen*”. In deze vergunning worden werkzaamheden met een aantal gespecificeerde *no-known vector* (NKV) flavivirussen beschreven, namelijk *Rio Bravo virus*, *APOI virus*, *Modoc virus* en *Montana Myotis leukencephalitis virus*. De aangevraagde werkzaamheden met deze virussen zijn conform de inschaling van flavivirussen in pathogeniteitsklasse 3 op ML-III inperkingsniveau vergund.

Het onderhavige wijzigingsverzoek betreft het toevoegen aan de bestaande vergunning van werkzaamheden met de NKV virussen *Cell fusing agent* (CFA) en *Yokose virus* (YokV). De COGEM wordt verzocht te adviseren over werkzaamheden met CFA en YokV.

### Flavivirussen

Het genus *Flaviviridae* omvat ruim tachtig virussen waarvan een groot aantal geassocieerd wordt met humane ziekten. Infecties met flavivirussen worden eveneens aangetroffen in gedomesticeerde dieren (o.a. kalkoen, varken, schaap en hond) en wilde dieren (o.a. ratten en vleermuizen). Bekende flavivirussen zijn het *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV) en *West Nile virus* (WNV). Flavivirussen kunnen op basis van hun verspreidingsmechanisme worden ingedeeld in drie groepen: *tick-borne*, *mosquito-borne* en *no-known vector*. Vijftig procent van de flavivirussen worden overgedragen door muggen (*mosquito-borne*) en ruim een kwart door teken (*tick-borne*). Transmissie van zowel YFV als DENV en WNV geschiedt via beten van geïnfecteerde muggen. De NKV virussen vormen een minder goed bestudeerde groep flavivirussen waarvoor overdracht via een geleedpotige vector niet is vastgesteld. De meeste NKV virussen zijn geïsoleerd uit knaagdieren en vleermuizen (1).

Flavivirussen zijn membraan-bevattende virussen bestaande uit een enkelstrengs positieve RNA-streng van circa 11 kb omgeven door nucleocapside en een envelop. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne. Door splitsing worden drie structurele eiwitten (C, prM en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd. Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De overige twee structurele eiwitten; prM en E vormen samen met het gastheermembraan de envelop. De NS-genen zijn betrokken bij de replicatie van het virus. De NS genen coderen voor helicase, polymerase of protease óf zijn betrokken bij het inpakken van het RNA in het virusdeeltje(2).

### ***Cell fusing agent virus (CFA)***

Over het *Cell fusing agent virus* zijn weinig gegevens bekend. Het originele virusisolaat van CFA is geïsoleerd in een muggen cellijn (3). De aanwezigheid van het virus veroorzaakte celfusie in deze insectencellijn. Er zijn geen andere isolaten van dit virus bekend en zover bekend is het nooit bij andere organismen aangetoond. Er bestaan vermoedens dat CFA een insecten flavivirus betreft dat mogelijk een voorloper is van de zogenaamde *arthropod-borne flavivirussen*. CFA kan niet worden vermeerderd in animale cellijnen en vertoont een geringe genomische verwantschap met andere groepen flavivirussen (*tick-borne, mosquito-borne en no-known vector*)(4, 5,6).

### ***Yokose virus (YokV)***

Over het *Yokose virus* zijn weinig gegevens bekend. De details van de isolatie van de initiële karakterisatie van het *Yokose virus* zijn niet gepubliceerd. Het YokV is in 1971 geïsoleerd uit een vleermuis (*Miniopterus fuliginosus*). In 2005 werd de volledige sequentie van het virus gepubliceerd (7). Uit de sequentie data blijkt YokV het meest overeen te komen met het *Entebbe Bat virus* (EntV, Uganda) en *Sokuluk virus* (SolV, Rusland) (5,6,7). Evenals YokV zijn deze virussen geïsoleerd uit vleermuizen zonder dat deze klinische symptomen vertoonden. Uit onderzoek is gebleken dat EntV en SolV zich kunnen vermeerderen in insectencellen (C6/36) (8). Dit soort experimenten zijn niet beschreven voor YokV. Infectie met YokV is nooit aangetoond bij mensen of andere dieren dan vleermuizen. De transmissievector voor YokV is onbekend.

### **Eerdere COGEM adviezen**

Op een paar uitzonderingen na zijn de *Flaviviridae* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. De uitzonderingen zijn het *Border diseasevirus*, *Bovine virusdiarrhee virus* en het *Hepatitis C virus*. Deze zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

In het verleden heeft de COGEM vier maal geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met flavivirussen. Het betrof werkzaamheden met het *Dengue virus*, *Yellow fever virus* en het *West Nile virus* (9,10,11). Voor het merendeel van de werkzaamheden adviseerde de COGEM een ML-III inperkingniveau. Alleen voor de werkzaamheden waarbij gebruik werd gemaakt van zogenaamde ‘pseudo infectious particles’ heeft de COGEM een ML-II niveau geadviseerd. Daarnaast is het *Klassieke varkenspest virus* in het COGEM advies ‘Classificatie van dierpathogene virussen’ ingedeeld in dierpathogeniteitsklasse 4 (12).

### **Overweging en advies**

De aanvrager heeft al een vergunning voor het werken met een aantal gespecificeerde NKV flavivirussen: *Rio Bravo virus*, *APOI virus*, *Modoc virus* en *Montana Myotis leukencephalitis virus*. De werkzaamheden met deze flavivirussen zijn ingeschaald op ML-III niveau. De aanvrager wil aan de bestaande vergunning twee NKV virussen toevoegen te weten CFA en YokV. De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van de productie van en

infectie met genetisch gemodificeerde CFA en YokV en infectie van animale cellen met deze virussen.

Van beide virussen zijn relatief weinig gegevens bekend. Van het CFA virus zijn geen andere isolaten bekend dan de geïsoleerde stam uit een insectencellijn en het virus is nooit bij andere organismen aangetoond. Ook van YokV zijn infecties nooit aangetoond bij de mens. Gezien de geringe hoeveelheid literatuur over de herkomst, overdracht en verspreiding van deze virussen en de verwantschap van deze virussen met enkele ernstige humane en dierlijke pathogenen in het genus *Flaviviridae* kan de COGEM instemmen met de door VROM voorgestelde inschaling op inperkingsniveau ML-III van de voorgenomen werkzaamheden (de productie van en infectie met de genetisch gemodificeerde NKV flavivirussen CFA en YokV).

Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de productie van en infectie met genetisch gemodificeerde op gele koorts virus (YFV-17D) gebaseerde chimere flavivirus partikels. YFV-17D stam is een humane geattenuerde vaccinstam van het *Yellow fever virus*. De aanvrager is voornemens om de structurele genen PrM en E van deze stam uit te wisselen met de overeenkomstige genen van CFA en YokV. Deze genen coderen voor oppervlakte-eiwitten die een rol spelen bij de immuniteit tegen deze virussen.

De sterk geattenuerde vaccinstam YFV-17D wordt ingeschaald in pathogeniteitsklasse II. De virussen YFV, CFA en YokV zijn RNA virussen die tot dezelfde virusfamilie behoren. Uitswisseling van de structurele PrM en E kunnen mogelijk een verandering in tropisme en replicatie veroorzaken. Gezien de geringe hoeveelheid gegevens die bekend zijn over het mogelijke effect van de insertie van bovengenoemde oppervlakte-eiwitten, kan de COGEM instemmen met het voorstel de beschreven werkzaamheden met de chimere virussen in te schalen op ML-III niveau.

## Conclusie

De COGEM stemt in met het voorstel de voorgenomen werkzaamheden met het *Cell fusing agent virus* (CFA) en het *Yokose virus* (YokV) in te schalen op ML-III niveau. De COGEM is van mening dat met het hanteren van de geldende voorschriften voor dit inperkingsniveau de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Gould EA, Solomon T (2008) Pathogenic flaviviruses, *Lancet* 2008; 371: 500-09
2. Fields of Virology (2001) vol. 1, 4<sup>th</sup> edition
3. Stollar V, Thomas VL (1975) An Agent in the Aedes aegypti Cell Line which causes fusion of Aedes albopictus cells. *Virology* vol. 64; pp367-377 (1975)
4. Cammisa-Parks H et al (1991) The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology* vol 189; pp 511-524
5. Kuno G, Chang GJ (1998) Phylogeny of the genus flavivirus. *J. Virology*. Vol. 72; pp72-83 (1998)

6. Kuno G, Chang GJ (2006) Characterization of sepik and Entebbe bat viruses closely related to yellow fever virus. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* vol 75; pp 1165-1170
7. Tajima S et al (2005). Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* vol. 332; pp 38-44
8. Varelas-Wesley I, Calisher CH (1982) Antigenic relationships of flaviviruses with undetermined arthropod-borne status. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* vol. 31; pp 1273-1284
9. COGEM advies (2002) Onderzoek aan dengue virussen en dengue virus vaccin kandidaten (CGM020823-03)
10. COGEM advies (2003) Evaluatie van een *Yellow fever virus* (YFV) recombinant met M/E-geninsertie van het *West Nile virus* (WNV) in proefdieren (CGM030930-04)
11. COGEM advies (2005) Pseudo-infectieuze virusdeeltjes; een modelsysteem voor het bestuderen van infectieprocessen van flavivirussen (GM050615-01)
12. COGEM advies (2006) Classificatie van dierpathogenen (CGM/060420-04)