

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer A.A. Aartsen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 02 september 2025
KENMERK CGM/250902-01
ONDERWERP Advies Inschaling van werkzaamheden met chimere (CHIKV/SFV) alfavirussen

Geachte heer Aartsen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 20-208_006 getiteld 'Productie van - en infectie met chimere virussen in animale cellen (III)', ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (chimere) alfavirussen. De aanvrager wil deze virussen produceren in dierlijke cellen en vervolgens andere dierlijke cellen ermee te infecteren. In deze chimere virussen zijn verschillende genen van het Chikungunya virus (CHIKV) en het Semliki Forest virus (SFV) uitgewisseld. Beide virussen kunnen ziekte veroorzaken bij mensen en dieren, en worden door muggen verspreid. De virussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 (CHIKV) en 2 (SFV).

De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat de chimere virussen meer pathogeen zullen zijn dan de betreffende oudervirussen, maar zij kan niet uitsluiten dat de pathogeniteit of virulentie van de chimere virussen vergelijkbaar is met die van het meest pathogene oudervirus (CHIKV). De aanvrager wil de werkzaamheden uitvoeren op inperkingsniveau ML-III met een aanvullend voorschrift om prik- en snijongevallen te voorkomen.

Op basis van de verwachte eigenschappen van de chimere virussen adviseert de COGEM om de werkzaamheden op ML-III uit te voeren, met inachtneming van het voorgestelde aanvullende voorschrift. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, onder navolging van het voorgestelde voorschrift, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

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

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

Advies Inschaling van werkzaamheden met chimere (CHIKV/SFV) alfavirussen

COGEM-advies CGM/250902-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 20-208_006) over de inschaling van werkzaamheden met verschillende genetisch gemodificeerde (gg-)alfavirussen. De aanvraag is afkomstig van de Wageningen Universiteit. De aanvrager is voornemens om chimere virussen te produceren in dierlijke cellen en vervolgens eveneens dierlijke cellen te infecteren met de chimeren. De chimeren bestaan uit combinaties van de niet-structurele genen van het Chikungunya virus (CHIKV; species *Alphavirus chikungunya*) met de structurele genen van het Semliki Forest virus (SFV; species *Alphavirus semliki*), en andersom. Daarnaast worden chimeren geproduceerd waarin de nsP3-genen geheel of gedeeltelijk zijn uitgewisseld. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-III, met inachtneming van een aanvullend voorschrift. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit inschalingsvoorstel met inbegrip van het aanvullende voorschrift.

2. Achtergrondinformatie over de gebruikte virussen

2.1 Algemene kenmerken alfavirussen

Alfavirussen (genus *Alphavirus*; familie *Togaviridae*) hebben een breed gastheerbereik en kunnen onder andere vogels, zoogdieren, vissen en insecten infecteren. Alfavirussen worden voornamelijk verspreid via bloedzuigende insecten, met name muggen.^{1,2} Het genus *Alphavirus* kent 32 species,³ waaronder verschillende soorten die ziekten veroorzaken bij mens of dier, zoals Chikungunya virus (CHIKV), Ross River virus (RRV), Semliki Forest virus (SFV), Sindbis virus (SINV) en Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). Voor veel alfavirussen geldt dat de mens als 'dead-end-host' wordt beschouwd, omdat de virale titers in het bloed doorgaans niet hoog genoeg zijn om muggen te infecteren.^{2,4} Voor CHIKV is echter wel mens-mug-mensbesmetting gerapporteerd.⁵

Alfavirusdeeltjes bevatten een positief enkelstrengs RNA-genoom van ongeveer 11 tot 12 kb.⁶ Aan beide uiteinden van het genoom ligt een 'untranslated region', en het virale RNA heeft een 5'-cap-structuur en een poly-A-staart aan het 3'-uiteinde. In het genoom bevinden zich twee 'open reading frames' (ORF's). Het ORF aan het 5'-uiteinde codeert voor de niet-structurele eiwitten (nsP1-nsP4), die als polyproteïne worden geproduceerd en, na klieving door nsP2, een rol spelen bij de replicatie van het virale genoom.⁷ Het ORF aan het 3'-uiteinde codeert voor de polyproteïne met de structurele eiwitten (C, E3, E2, 6K en E1), die samen het virale deeltje vormen.⁸ Dit polyproteïne wordt tot expressie gebracht vanaf een subgenomisch mRNA, dat getranscribeerd wordt vanaf een interne promotor, gelegen tussen beide ORF's. In sommige gevallen leidt '(-1) ribosomal frameshifting' tijdens de translatie tot de productie van een extra eiwit, genaamd TF.⁶ Virale en cellulaire proteasen klieven de structurele polyproteïnes in de individuele eiwitten.

2.2 Chikungunya virus (CHIKV)

CHIKV (species *Alphavirus chikungunya*) veroorzaakt bij de mens een ernstige ziekte, chikungunya, die doorgaans niet levensbedreigend is. Symptomen zijn onder andere hoge koorts, gewrichtspijn en huiduitslag. Hoewel de infectie meestal na enkele weken verdwijnt, kunnen sommige patiënten maanden of zelfs jaren klachten aan de gewrichten houden.⁹ Op dit moment zijn er twee vaccins beschikbaar voor mensen.^{10,11} Er is geen specifieke antivirale behandeling tegen chikungunya; de behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding.

CHIKV komt voor in landen rondom de Indische Oceaan, Zuidoost-Azië, Afrika, de Cariben, Noord- en Zuid-Amerika en Zuid-Europa. Overdracht van CHIKV vindt plaats via steekmuggen. De Gelekoortsmug (*Aedes aegypti*) is de primaire vector, maar ook andere *Aedes*-muggen, zoals de Aziatische tijgermug (*Aedes albopictus*), kunnen CHIKV overdragen.¹² Deze twee soorten worden in Nederland beschouwd als invasieve exoten; ze worden sporadisch aangetroffen en ook bestreden om vestiging in Nederland te voorkomen.¹³

2.3 Semliki Forest virus (SFV)

SFV (species *Alphavirus semliki*) veroorzaakt bij mensen doorgaans een mild ziektebeeld, met symptomen zoals koorts en hoofdpijn. Bij dieren zoals paarden, muizen, ratten, hamsters, konijnen en cavia's kan SFV hersenontsteking (encefalitis) veroorzaken.¹ Het ziektebeeld is afhankelijk van de leeftijd van het dier, de route van inoculatie en de virulentie van de specifieke SFV-stam.¹⁴ Infecties bij mensen komen voor in Zuid-Afrika, Mozambique, Kameroen, Centraal-Afrikaanse Republiek, DR Congo, Nigeria, Senegal en Oeganda. SFV wordt overgedragen door steekmuggen, met name *Aedes abnormalis* en *Aedes argenteopunctatus*.¹⁵

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt om een uitbreiding van een eerdere vergunning waarover de COGEM reeds heeft geadviseerd.^{16,17} Dit betrof werkzaamheden waarbij chimere alfa- en/of flavivirussen in dierlijke cellen werden geproduceerd en vervolgens gebruikt worden voor de infectie van cellen. De chimere virussen in de oorspronkelijke vergunning bestaan onder andere uit uitwisseling van niet-structurele en structurele genen van Zika virus (ZIKV) of West Nile virus (WNV) met Usutu virus (USUV), 'Venezuelan equine encephalitis' virus (VEEV) vaccinstam TC-83 met CHIKV en 'tick-borne encephalitis' virus (TBEV) met USUV.

In de huidige aanvraag wordt verzocht om een uitbreiding waarbij vier verschillende chimere virussen zullen worden geproduceerd. Eén variant bevat de niet-structurele genen van CHIKV in combinatie met de structurele genen van SFV (nsCHIKV/sSFV). In een andere variant zijn de niet-structurele genen van SFV gecombineerd met de structurele genen van CHIKV (nsSFV/sCHIKV). Daarnaast zullen twee chimere virussen worden geproduceerd waarin uitsluitend het nsP3-gen geheel of gedeeltelijk is uitgewisseld (CHIKV-nsP3/nsP3SFV en SFV-nsP3/nsP3CHIKV). De herkomst van de 5'- en 3'-uiteinden van het genoom van de chimeren is gelijk aan die van de nsP1-, nsP2- en nsP4-genen in de desbetreffende chimeer.

De productie van de virussen kan op drie verschillende manieren plaatsvinden. Cellen kunnen worden getransfecteerd met:

1. een plasmide dat de coderende sequenties voor het chimere virus bevat;

2. circulair viraal DNA, vervaardigd met de CPER-methode, waarbij het virale genoom wordt samengesteld uit verschillende PCR-producten door overlappende fragmenten te fuseren;
3. in vitro geproduceerd viraal chimeer RNA.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, met inachtneming van de volgende aanvullende maatregel:

- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen).

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft CHIKV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 en SFV in pathogeniteitsklasse 2.^{18,19}

Daarnaast heeft de COGEM eerder geadviseerd over werkzaamheden met flavi- en alfavirus-chimeren, bestaande uit combinaties van virussen uit pathogeniteitsklasse 2 en 3 (combinaties van USUV/WNV, USUV/ZIKV, VEEV TC-83/CHIKV en TBEV/USUV).^{16,17}

In beide gevallen kon de COGEM ermee instemmen om de werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, met inachtneming van de volgende aanvullende maatregelen:

- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen);
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan werkzaamheden met chimeren die een ZIKV component bevatten.

5. Overweging

De aanvrager is voornemens vier verschillende alfavirus-chimeren te produceren (nsCHIKV/sSFV, nsSFV/sCHIKV, CHIKV-nsP3/nsP3SFV en SFV-nsP3/nsP3CHIKV) en deze te gebruiken om verschillende dierlijke cellen te infecteren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met CHIKV/SFV-chimeren in associatie met dierlijke cellen op ML-III inperkingsniveau.

De aanvrager heeft een risicobeoordeling aangeleverd voor de werkzaamheden met de CHIKV/SFV-chimeren. Daarin wordt aangegeven dat verwacht wordt dat het gastheerbereik en de transmissie van de CHIKV/SFV-chimeren vergelijkbaar zullen zijn met die van de wildtypevirussen waaruit de chimeren zijn samengesteld. Dit is gebaseerd op het feit dat zowel CHIKV als SFV wordt overgedragen door *Aedes*-muggen en in staat zijn om zoogdieren te infecteren. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat het onwaarschijnlijk is dat de CHIKV/SFV-chimeren meer pathogeen zullen zijn dan CHIKV, het meest pathogene uitgangsvirus.

CHIKV kan diverse celtypen infecteren, waaronder fibroblasten, macrofagen, lymfocyten, endotheel cellen en spiercellen. SFV heeft in sommige knaagdieren een sterke affiniteit voor cellen van het zenuwstelsel, specifiek neuronen en oligodendrocyten. De aanvrager stelt dat een nsCHIKV/sSFV-chimeer daarom mogelijk neuronen en oligodendrocyten van knaagdieren zou kunnen infecteren door een veranderd celtropisme. De COGEM merkt op dat dit waarschijnlijk geen invloed heeft op de transmissie en pathogeniteit van de nsCHIKV/sSFV-chimeer.

De functie van het nsP3 bij de replicatie van het alfavirusgenoom is nog grotendeels onbekend. Uit wetenschappelijke literatuur blijkt dat het nsP3-eiwit van zowel SFV als CHIKV bindt aan het gastheereiwit G3BP.²⁰ Voor zover bekend zijn er geen aanwijzingen dat interacties tussen nsP3 en gastheereiwitten direct gerelateerd zijn aan klinische symptomen.

Er zijn geen wetenschappelijke studies bekend waarin CHIKV/SFV-chimeren worden beschreven waarbij de volledige structurele en niet-structurele ORFs zijn uitgewisseld. Wel is in een studie aangetoond dat chimere virussen, waarin nsP2 of een gedeelte van nsP3 van SFV is vervangen door de corresponderende coderende sequenties van CHIKV, een verlaagde virustiter vertonen.²¹ De aanvrager verwijst naar deze studie als bewijs dat CHIKV/SFV-chimeren doorgaans lagere virustiters bereiken dan de wildtypevirussen. In een andere studie is een deel van het structurele, receptor bindend E2-eiwit van CHIKV vervangen door het corresponderende domein van het SFV E2-eiwit, wat resulteerde in een verminderde fitness van het virus.²² De COGEM merkt daarnaast op dat het uitwisselen van genen tussen verschillende virussoorten, zoals tussen flavi- en alfavirussen^{21,22, 23, 24, 25}, over het algemeen leidt tot attenuatie.

De verspreiding van CHIKV/SFV-chimeren blijft afhankelijk van een vector (*Aedes*-mug). In de voorgestelde experimenten zullen echter geen muggen worden gebruikt. De COGEM merkt op dat mensen voor zowel SFV als CHIKV doorgaans een dead-end host vormen; alleen bij hoge virustiters in het bloed is mens-mug-mens transmissie mogelijk. Omdat de chimere virussen lagere titers produceren, is de kans op verdere verspreiding bij onbedoelde blootstelling van medewerkers verwaarloosbaar klein.

Omdat verminderde pathogeniteit en fitness voor de CHIKV/SFV-chimeren uit de aanvraag echter niet met experimentele gegevens is onderbouwd, gaat de COGEM in haar overwegingen uit van een scenario waarin de betreffende chimeren qua pathogeniteit, gastheerbereik, transmissie en virulentie als gelijkwaardig aan de uitgangsvirussen. In dit scenario hebben de chimere virussen ten hoogste een vergelijkbare pathogeniteit met CHIKV.

6. Advies

Alles in overweging nemende adviseert de COGEM de werkzaamheden op ML-III uit te voeren, met inachtneming van het voorgestelde aanvullende voorschrift, betreffende het gebruik van 'sharps' en kevlarhandschoenen. De COGEM is van oordeel dat, bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau onder navolging van het aanvullende voorschrift, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. Togaviridae. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 20 augustus 2025)
3. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy Browser. <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht: 20 augustus 2025)
4. Skidmore AM & Bradfute SB (2023). The life cycle of the alphaviruses: From an antiviral perspective. Antiviral Res. 209: 105476

5. US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of Chikungunya Virus. <https://www.cdc.gov/chikungunya/php/transmission/index.html> (bezocht: 20 augustus 2025)
6. Barraza Sánchez JJ et al. (2025). Functional RNA elements in alphavirus genomes. *Curr. Microbiol.* 82:364
7. Rupp JC et al. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483-2500
8. Khongsichit S et al. (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *J. Biomed. Sci.* 28:84
9. Goupil BA et al. (2016). A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol. J.* 10: 129-140
10. European Medicines Agency. Ixchiqu. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ixchiqu> (bezocht: 20 augustus 2025)
11. European Medicines Agency. Vimkunya. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vimkunya> (bezocht: 20 augustus 2025)
12. Lounibos LP et al. (2016). Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for Chikungunya Virus. *J. Infect. Dis.* 214: suppl 5
13. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Aziatische tijgermug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knuttten-en-teken/aziatische-tijgermug> (bezocht: 27 augustus 2025)
14. Fazakerley JK et al. (1993). Replication of the A7(74) strain of Semliki Forest virus is restricted in neurons. *Virology.* 195: 627-37
15. Braack L et al. (2018). Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasites Vectors* 11: 29
16. COGEM (2020). Inschaling werkzaamheden met flavivirus en alphavirus chimeren. COGEM advies CGM/201105-01
17. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met chimere flavivirussen op ML-III. COGEM advies CGM/231219-01
18. COGEM (2010). Classificatie van Chikungunya virus. COGEM advies CGM/100304-08
19. COGEM (2024). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten van virussen. COGEM advies CGM/241210-02
20. Kim DY et al. (2016). New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. *PLoS Pathog.* 12: e1005810
21. Teppor M et al. (2021). Semliki Forest virus chimeras with functional replicase modules from related Alphaviruses survive by adaptive mutations in functionally important hot spots. *J. Virol.* 95: e0097321
22. Chuong C et al. (2024). Enhanced attenuation of chikungunya vaccines expressing antiviral cytokines. *NPJ Vaccines.* 9: 59
23. Engel A et al. (2011). Chimeric tick-borne encephalitis/dengue virus is attenuated in *Ixodes scapularis* ticks and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11: 665-674
24. Yoshii K et al. (2008). Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 89: 200-211
25. Harrison JJ et al. (2020). Antigenic characterization of new lineage II insect-specific Flaviviruses in Australian mosquitoes and identification of host restriction factors. *mSphere* 5: e00095-20