

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

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 08 september 2016
KENMERK CGM/160908-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van en werkzaamheden met gg-IIV-6

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van de adviesvraag over de vergunningaanvraag IG 16-284_2.8-000 getiteld 'Verzoek tot inschaling van het *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6), zodat dit virus gebruikt kan worden voor de deletie van het 340R gen door middel van homologe recombinatie' van de Stichting Katholieke Universiteit te Nijmegen deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6) en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) IIV-6. De aanvrager is van plan om de rol van het virale gen 340R van IIV-6 te onderzoeken. Daartoe zal dit gen uit het genoom van IIV-6 worden gehaald en worden vervangen door het gen coderend voor een groen fluorescerend eiwit, eGFP.

Het IIV-6 kan verschillende soorten insecten infecteren. Afhankelijk van de gastheer kan deze infectie dodelijk zijn, maar in de meeste gevallen zijn de gevolgen van een infectie beperkt. Tot op heden zijn deze virussen niet geassocieerd met infectie en ziekte van de mens. IIVs worden wereldwijd aangetroffen. De wijze waarop IIVs zich kunnen verspreiden is niet precies bekend, al zijn er aanwijzingen dat IIVs ten gevolge van kannibalisme en via verwondingen tussen insecten kunnen worden overgedragen.

Op basis van deze kenmerken adviseert de COGEM om IIV-6 als strikt dierpathogeen aan te merken en in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.

Om het gg-IIV-6 virus te kunnen genereren zal de aanvrager een plasmide maken met de coderende sequentie van het eGFP en aan weerszijden een klein deel van de genomsequentie van het IIV-6. Conform de Regeling ggo adviseert de COGEM deze kloneringswerkzaamheden op inperkingsniveau ML-I uit te voeren.

Gezien de classificatie van IIV-6 en het feit dat de COGEM verwacht dat het beoogde gg-IIV-6 niet pathogener zal zijn dan het wildtype virus, adviseert zij de productie van en de infectiewerkzaamheden met het gg-IIV-6 op inperkingsniveau ML-II in te schalen.

Op de geadviseerde inperkingsniveau's acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verbonden aan bovengenoemde werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



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 van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Invertebrate iridescent virus 6*

COGEM advies CGM/160908-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 16-284) met als titel ‘Verzoek tot inschaling van het *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6) zodat dit virus gebruikt kan worden voor de deletie van het 340R gen door middel van homologe recombinatie’ van de Stichting Katholieke Universiteit te Nijmegen, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van het *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6). Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen als strikt dierpathogeen aangemerkt kunnen worden.

De aanvrager wil genetisch gemodificeerd (gg-)IIV-6 gebruiken om *in vitro* de rol van het 340R eiwit van IIV-6 in de infectiecyclus te onderzoeken. Daartoe wordt het 340R gen uit het genoom van IIV-6 vervangen door een coderende sequentie voor een groen fluorescerend markereiwit (eGFP). Naast de classificatie van IIV-6 is de COGEM ook gevraagd te adviseren over de inschaling van de *in vitro* werkzaamheden met gg-IIV-6.

1.1. Iridoviridae

De virussen die tot de familie van de *Iridoviridae* behoren, hebben een lineair dubbelstrengs DNA genoom van 140-303 kbp.¹ Deze familie omvat vijf genera. Dit zijn: *Iridovirus*, *Chloridivirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* en *Megalocytivirus*.

Het iridovirusdeeltje is een complex bouwwerk dat 36 verschillende polypeptiden kan omvatten. Het bestaat echter voor ca. 40% uit het zogenaamde ‘major capsid protein’ (MCP). Dit eiwit is zeer geconserveerd. Het capsid is icosahedrisch van vorm en is gewoonlijk tussen de 120 en 200 nm groot. In het geval van de virussen behorend het genus *Lymphocystivirus* kan de diameter zelfs oplopen tot 350 nm. De virusdeeltjes worden door de celmembraan van de gastheer omgeven als zij via budding de gastheercellen verlaten. Dit membraan verhoogt de infectiviteit maar is niet vereist, aangezien kale deeltjes zonder membraan ook infectieus zijn.

De iridovirussen zijn geïsoleerd uit een brede reeks van geleedpotigen, maar zijn ook aangetroffen in slakken, een ringworm en een nematode.⁵

1.2 *Invertebrate iridescent virus 6*

Het IIV-6 dat voorheen als *Chilo iridescent virus* bekend stond, behoort tot het genus *Iridovirus*. Virussen behorend tot dit genus (IIVs) zijn geïsoleerd uit een brede reeks van arthropoden met een aquatische of vochtige habitat.¹ Het IIV-6 virus is voor het eerst aangetroffen in de Aziatische rijstboorder *Chilo suppressalis*.² De rups van deze grasmot is een belangrijk plaaginsect in de rijstbouw, waardoor IIV-6 als potentieel interessant wordt beschouwd voor de biologische bestrijding van deze rups. Afhankelijk van de gastheer kan een infectie met IIVs zowel lethaal als niet-lethaal verlopen. In het eerste geval zijn de insecten duidelijk geïnfecteerd, ze hebben een violet, blauw of turquoise-achtige verschijning en overlijden in het larve- of pop-stadium. In het

tweede geval ogen de gastheren normaal, ontwikkelen ze zich tot het volwassenstadium en kunnen zich zelfs voortplanten.^{3,4} Ten gevolge van de infectie duurt de ontwikkeling echter langer, en leidt het onder andere tot een verminderde lichaamsgrootte, reproductievermogen en levensduur.³

Infecties met IIVs zijn op alle continenten aangetroffen met uitzondering van Antarctica.⁵ Hierbij wordt hoofdzakelijk melding gedaan van de duidelijk zichtbare lethale infecties en veel minder van de niet-lethale infecties, hoewel deze waarschijnlijk veel vaker voorkomen. In veel gevallen blijft de identificatie van de specifieke IIV soort dat verantwoordelijk is voor de beschreven infectie, achterwege. In Nederland is IIV-6 aangetroffen in de krekelloorten *Gryllus campestris* L. en *Acheta domesticus* L., waarin het een lethale infectie veroorzaakte.^{6,7} Het betrof hier krekels van een commerciële kweker en de mogelijke oorsprong van de infectie is onduidelijk.

De wijze waarop IIVs worden overgedragen is niet precies bekend. De virussen blijken niet erg infectieus na inname via de mond, maar zijn dit wel na injectie. Er zijn op dit moment aanwijzingen dat in bepaalde insectensoorten besmetting met IIV via kannibalisme en via verwondingen kan optreden.⁸ Daarnaast lijken IIVs ook via insectenparasieten overgedragen te kunnen worden.⁹

2. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan om gg-IIV-6 te produceren, waarin het 340R gen is vervangen door de coderende sequentie voor het markereiwit, eGFP. Om het gg-IIV-6 te genereren wordt gebruikt gemaakt van een recombinatieplasmide dat gebaseerd is op pGEM-3Zf waarin de coderende sequentie voor eGFP is gekloneerd met aan weerszijden een 750 bp IIV-6 sequentie. Na constructie van het recombinatieplasmide wordt het beoogde gg-IIV-6 gegeneerd in insectencellen via homologe recombinatie tussen het wildtype IIV-6 en genoemd recombinatieplasmide. Het gg-IIV-6 wordt vervolgens gebruikt voor infectie van insectencellen om het effect van 340R op de infectiecyclus te kunnen bestuderen.

3. 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.¹⁰ 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.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;

- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

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.

Naast de pathogeniteitsklasse-indeling wordt bij de inschaling van ggo-werkzaamheden met virussen of virale sequenties in Bijlage 5 van de Regeling ggo ook onderscheid gemaakt tussen virussen die strikt dierpathogeen zijn, en virussen die pathogeen zijn voor mens en dier.

In Bijlage 4 van de Regeling ggo is een lijst van virussen opgenomen met de pathogeniteitsklasse waarin zij ingedeeld zijn. Tevens wordt voor ieder van de virussen in deze Bijlage aangegeven of zij tot de groep van humaan- en dierpathogene virussen of de groep van strikt dierpathogene virussen worden gerekend.

4. Eerder COGEM advies

4.1 Classificatie van dierpathogenen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹¹ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt:

Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.

De overweging die de COGEM hanteert om dierpathogenen te classificeren wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.¹² De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,

- b) de enzoïtische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

4.2 Classificatie van insectenvirussen

In 2016 heeft de COGEM voor het eerst geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van drie insectenvirussen.¹³ Het betrof de baculovirussen: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), *Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus* (BmNPV) en *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV). Op basis van de eigenschappen van AcMNPV, BmNPV en TnSNPV en het feit dat deze virussen nooit in verband gebracht zijn met infectie of ziekte bij zoogdieren of bij de mens heeft de COGEM geadviseerd deze virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en aan te merken als strikt dierpathogeen.

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van virussen behorend toe de familie van de *Iridoviridae*.

5. Inschaling van IIV-6 in andere landen

Door het Belgische Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP) zijn verschillende iridovirussen, waaronder het insecteniridovirus, *Tipula iridescent virus* geklassificeerd.¹⁴ Deze zijn over het algemeen in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld. Het *Erythrocytic necrosis virus*, een vissen iridovirus, vormt hierop een uitzondering. Dit virus is door de WIV-ISP in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld. Het IIV-6 is nog niet geklassificeerd in België. Ook in Zwitserland, Frankrijk en Duitsland zijn enkele leden van de *Iridoviridae* in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld, maar in geen van de gevallen betreft het een classificatie van IIV-6.^{15,16,17}

6. Overweging en advies

6.1 Classificatie

De IIV soorten kunnen een brede groep van insectensoorten infecteren. Afhankelijk van de betreffende gastheer kan het IIV-6 zowel een lethale als een niet-lethale infectie veroorzaken. De niet-lethale infectie van insecten blijft vaak onopgemerkt. Voor zover bij de COGEM bekend, is IIV-6 in de wetenschappelijke literatuur niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

Soorten behorend tot het genus *Iridovirus* worden wereldwijd aangetroffen en kunnen derhalve ook in Nederland als enzoïtisch worden beschouwd. De wijze waarop verspreiding van IIVs plaatsvindt, is niet geheel duidelijk, maar er zijn aanwijzingen dat IIVs via kannibalisme en verwondingen overgedragen kunnen worden. Ook lijken parasieten een rol te kunnen spelen bij de verspreiding van IIVs.

Een effectieve behandeling of profylaxe tegen het virus is niet voor handen, al kan verspreiding van virus door insectenbestrijding wel worden toegepast.

Bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM het IIV-6 in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en aan te merken als strikt dierpathogeen.

6.2 Kloneringswerkzaamheden

De aanvrager is voornemens het 340R gen uit IIV-6 te vervangen door eGFP. Daartoe wordt een recombinatie plasmide vervaardigd en opgegroeid in bekende *E.coli* laboratoriumstammen. Het recombinatieplasmide is gebaseerd op pGEM-3Zf en bevat de coderende sequentie voor eGFP dat aan beide kanten wordt geflankeerd door een IIV-6 sequentie van ca. 750 bp. Aangezien zowel de te gebruiken gastheren als de vector in Bijlage 2 op respectievelijk lijst A1 en A2 staan vermeld, en de COGEM eGFP niet als een schadelijk genproduct beschouwt, adviseert de COGEM de kloneringswerkzaamheden conform Inschalingsartikel 5.2 van de Regeling ggo op inperkingsniveau ML-I in te schalen.

6.3 Productie van en infectie met gg-IIV-6

Het beoogde gg-IIV-6 wordt in drosophilacellen gegenereerd door homologe recombinatie tussen het recombinatieplasmide en wildtype IIV-6. Bij de homologe recombinatie vindt uitwisseling plaats van het 340R gen voor eGFP. Het 340R gen codeert voor een dsRNA bindend eiwit en wordt in meerdere IIVs aangetroffen.¹⁸ De COGEM verwacht dat het verlies van een evolutionair stabiel gen, zoals het 340R gen, het ggo zal verzwakken. Gezien de functie van het 340R eiwit is zij daarbij van mening dat het eGFP niet in staat is om het verlies van het 340R te compenseren. Zij verwacht derhalve dat het gg-IIV-6 niet pathogener zal zijn dan het uitgangsgenorganisme.

Op basis van bovenstaande en conform de indeling van wildtype IIV-6 in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM de productie van en de infectie-experimenten met het gg-IIV-6 op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Op dit inperkingsniveau is de COGEM van mening dat de eventuele risico's voor mens en milieu van voorgenomen *in vitro* werkzaamheden verwaarloosbaar klein zullen zijn.

7. Referenties

1. Jancovich JK *et al.* (2012). Family *Iridoviridae*. 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
2. Fukaya M & Nasu S (1966). A Chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) Appl. Entomol. Zool. 1:69-72
3. Marina CF *et al.* (1999). Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito. *Oecologia* 119: 383-388
4. Williams T (1993). Covert iridovirus infection of blackfly larvae. *Proc. R. Soc. Lond. B* 251:225-230
5. Williams T (2008). Natural invertebrate hosts of iridoviruses (Iridoviridae). *Neotrop. Entomol.* 37:615-632
6. Kleespies RG *et al.* (1999). Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range. *J. Invertebr. Pathol.* 73:84-90

7. Jakob NJ *et al.* (2002). Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate. *J. Gen. Vir.* 83:463-470
8. Williams T & Hernandez O (2006). Costs of cannibalism in the presence of an iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda* *Ecol. Entomol.* 31:106-113
9. Lopez M *et al.* (2002). Parasitoid-mediated transmission of an iridescent virus. *J. Invert. Pathol.* 80:160-170
10. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerd organismen milieubeheer 2013. <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html#d16e58339> (bezocht 6 sept 2016)
11. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
12. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
13. COGEM (2016). Classificatie van drie baculovirussen. COGEM advies CGM/160128-01
14. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (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. www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezocht: 5 september 2016)
15. 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: 5 september 2016)
16. Haut Conseil des Biotechnologies (HCB; 2014). Manuel du HCB pour l'utilisation confiné d'organismes génétiquement modifiés. www.hautconseilbiotechnologies.fr/en/system/files/file_fields/2015/06/30/manuelduconfine.pdf (bezocht: 5 september 2016)
17. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/ Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (BVL/ZKBS) (2016). Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen. www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html (bezocht 5 september 2016)
18. Wong CK *et al.* (2011). Genomic and proteomic analysis of Invertebrate iridovirus type 9 *J. Vir.* 85:7900-7911