

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

DATUM 30 mei 2018
KENMERK CGM/180530-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie Toscana virus (TOSV) en Sandfly fever Sicilian virus (SFSV) en inschaling werkzaamheden

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 18-066_2.8-000 getiteld 'Kloneringswerkzaamheden met Sandfly virussen' ingediend door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van Toscana virus (TOSV) en Sandfly fever Sicilian virus (SFSV). Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden van gg-TOSV en gg-SFSV in animale cellen.

TOSV en SFSV worden overgedragen door zandvliegen en veroorzaken in hun verspreidingsgebieden 'zandvliegkoorts' bij mensen. De vectoren (zandvliegen) van TOSV en SFSV komen niet van nature voor in Nederland. Op basis van de mogelijke wijze van overdracht en gezien het feit dat TOSV en SFSV hoofdzakelijk geassocieerd zijn met milde ziektegevallen is de COGEM van oordeel dat TOSV en SFSV ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kunnen worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.

Gezien deze inschaling acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd, indien de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met volvirulent gg-TOSV en gg-SFSV op ML-II inperkingsniveau worden uitgevoerd.

Onder de genoemde voorwaarden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen 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 IenW

Pathogeniteitsclassificatie Toscana virus (TOSV) en Sandfly fever Sicilian virus (SFSV) en inschaling werkzaamheden

COGEM advies CGM/180530-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld 'Kloneringswerkzaamheden met Sandfly virussen' (IG 18-066). De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van Toscana virus (TOSV) en Sandfly fever Sicilian virus (SFSV) en plaatsing van deze virussen op Bijlage 4 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit lijsten van micro-organismen die pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Daarnaast is de COGEM gevraagd om te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden van gg-TOSV en gg-SFSV in animale cellen.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

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

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.

3. SFSV en TOSV

Sandfly fever Sicilian virus (SFSV) en Toscana virus (TOSV) zijn negatieve enkelstrengs RNA virussen omgeven door een membraan die behoren tot de familie *Phenuiviridae*, orde Bunyavirales. Het genoom van bunyavirussen bestaat uit een 'large' (L), medium (M) en 'small' (S) segment die coderen voor onder andere de RNA-afhankelijke RNA polymerase, glycoproteïnen en het nucleocapside eiwit.^{1,5}

De 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV) heeft TOSV ingedeeld binnen het genus *Phlebovirus* als subspecies van de soort *Sandfly fever Naples phlebovirus* (SFNV).² Andere virussen die behoren tot de soort SFNV zijn onder andere Sandfly fever Naples (SFNV), Tehran virus (TEHV) en Massila virus (MASLV).²

Sandfly fever Sicilian virus (SFSV) is (nog niet) door de ICTV ingedeeld, maar staat op de lijst van virussen die waarschijnlijk binnen het genus *Phlebovirus* zullen worden onder gebracht.² Fylogenetische analyses laten zien dat SFSV te onderscheiden is van virussen behorende tot de soort SFNV.^{3,4,12} Inmiddels zijn er verschillende virussen geïsoleerd uit zandvliegsoorten die genetisch gerelateerd zijn aan SFSV en samen met SFSV een monofyletische groep vormen. Dit betreft onder andere het Dashli virus (DASHV) en 'Sicilian-achtige' virussen geïsoleerd uit Italië, India, Turkije (Sandfly fever Turkey virus (SFTV)) en Cyprus (Sandfly fever Cyprus virus (SFCV)). In de toekomst zullen deze virussen mogelijk onder één soort (waarschijnlijk Sandfly fever Sicilian virus) worden ondergebracht.^{3,4,5,6,11,12}

3.1 Transmissie en epidemiologie

SFSV en TOSV zijn arbovirussen die worden overgedragen door zandvliegen behorende tot de familie *Psychodidae* en subfamilie Phlebotominae. Een steek van een besmette vrouwelijke zandvlieg kan leiden tot zogenaamde 'zandvliegkoorts' bij de mens, ook wel bekend als 'pappataci' of 'phlebotomus' koorts.^{4,6} Dieren kunnen ook geïnfecteerd raken, maar worden voor zover bekend niet ziek.¹² Door de levenscyclus van de vectoren treden infecties voornamelijk op in de zomerperiode wanneer de zandvliegen actief zijn (mei t/m oktober).^{3,11}

Phlebotomine zandvliegen komen voor in de (sub-)tropen en gebieden met een warm gematigd klimaat.^{4,7} Phlebotomine zandvliegen waaronder de vectoren van SFSV (*Phlebotomus papatasi*) en TOSV (*P. perfiliewi* en *P. perniciosus*) komen niet in Nederland voor, maar komen wel wijdverspreid voor in Zuid-Europese landen.^{8,9,10}

Seroprevalentie studies bij mensen en gedomesticeerde dieren laten zien dat SFSV en TOSV actief circuleren in laatstgenoemd gebied.^{4,11,12} Zo is SFSV endemisch in het Middellandse Zeegebied. Voorheen kwam TOSV alleen voor in Italië en Portugal, maar het virus komt nu ook endemisch voor in o.a. Frankrijk, Spanje, Griekenland, Cyprus en Slovenië. Mogelijk is deze geografische uitbreiding

het gevolg van klimaatverandering. TOSV wordt dan ook gezien als een opkomende pathogeen.^{6,11} Net als hun vectoren komen SFSV en TOSV niet voor in Nederland.^{3,11,12}

3.2 Reservoir

Op dit moment is de natuurlijke gastheer van de virussen niet bekend. De virussen kunnen repliceren in de Phlebotomine zandvliegen en er wordt gedacht dat deze vectoren mogelijk als reservoir dienen.^{6,11,12} Hoewel SFSV- en TOSV-antistoffen zijn aangetroffen in serum van verschillende gedomesticeerde dieren, waaronder honden, katten, varkens, geiten koeien, schapen en paarden, is er tot op heden geen bewijs dat mensen of andere vertebraten als reservoir fungeren.^{4,6,11,12}

3.3 Ziekteverschijnselen

TOSV heeft een tropisme voor het centrale en perifere zenuwstelsel en is de hoofdveroorzaker van virale meningitis en meningo-encefalitis in de zomerperiode in Mediterrane landen waar het virus circuleert.^{4,6} Onder andere vakantiegangers die afreizen vanuit niet-endemische gebieden vormen een risicogroep.^{2,6,13,14,15} Ondanks het tropisme voor het zenuwstelsel verloopt een infectie met TOSV doorgaans asymptomatisch. Het kan milde koortsachtige ziekte veroorzaken die gemiddeld 7 dagen duurt zonder betrokkenheid van het centraal zenuwstelsel.^{6,11} Neuro-invasieve infecties zoals meningitis of meningo-encefalitis beginnen meestal met symptomen als hoofdpijn, koorts, spierpijn, misselijkheid en braken. Tevens kunnen nekstijfheid, het teken van Kernig en in sommige gevallen verminderde bewustzijn, tremor, gedeeltelijke spierverlamming en nystagmus (oogbewegingsafwijkingen) optreden.^{6,11} In de meeste gevallen is de afloop van een TOSV infectie gunstig en is er geen sprake van restletsel.^{6,11,12} Er zijn enkele gevallen gerapporteerd in de literatuur waarbij infectie met TOSV ernstige meningo-encefalitis, encefalitis, doofheid, persoonlijkheidsveranderingen, gedeeltelijke spierverlamming, spraakproblemen of langdurige bewusteloosheid tot gevolg had.^{15,16,17,18,19,20,21} Voor zover bekend is er één met TOSV-geïnfecteerd persoon door encefalitis overleden, dit betrof een 73-jarige man zonder medische voorgeschiedenis.²²

SFSV veroorzaakt in het algemeen milde ziekte dat zich kenmerkt door circa 3 dagen durende koorts, hoofdpijn, malaise, spierpijn, misselijkheid en retro-orbitale pijn.^{3,11} Het ‘Sicilian-achtige’ virus SFTV kan mogelijk een wat ernstiger ziektebeeld veroorzaken en naast hoofdpijn en misselijkheid leiden tot langdurige koorts en trombocytopenie.^{3,23,24} Ook is er één geval beschreven waarbij encefalitis geassocieerd was met SFTV infectie.²⁵

Op dit moment zijn er geen vaccins of antivirale therapieën beschikbaar voor SFSV en TOSV.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens volvirulent gg-TOSV en gg-SFSV *in vitro* te produceren in animale cellen. Hiertoe wordt de gehele genoomsequentie van TOSV of van SFSV in drie fragmenten gesynthetiseerd en in verschillende plasmiden gebracht. Gelijktijdige aanwezigheid van de constructen in BSR-T7/5 cellen kan leiden tot het ontstaan van replicatiecompetent virus. De aanvrager geeft aan dat er geen sequenties van verschillende phlebovirussen zullen worden gecombineerd.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over TOSV en SFSV, wel heeft zij verschillende subspecies behorende tot het genus *Phlebovirus* geïdentificeerd.^{26,27,28,29} Rift Valley fever virus is ingedeeld in

pathogeniteitsklasse 3 Huaiyangshan virus (Severe fever with thrombocytopenia virus) is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4 en Uukuniemi virus is ingedeeld als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2.^{27,28,29}

6. Classificaties andere beoordelende instanties

De ARBO-regelgeving heeft onder meer ten doel werknemers te beschermen tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia. In de Europese ARBO-richtlijn 2000/54/EG staan TOSV, zandvliegkoorts en 'andere als pathogeen bekend staande bunyaviridae' ingeschaald als klasse 2 pathogenen.³⁰

Het Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA) heeft het TOSV ingedeeld in risicogroep 2, met daarbij de opmerking dat aanvullende maatregelen moeten worden genomen bij het werken met geleedpotigen (natuurlijke vectoren) en / of bij dierstudies.³¹ De 'Health and Safety Executive' (HSE) van het Verenigd Koninkrijk en het Belgische Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP) hebben het TOSV virus ingedeeld in risicogroep 2.^{32,33} Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) heeft TOSV als humaanpathogeen ingedeeld in risicogroep 2.³⁴

De classificaties door andere beoordelende instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

7. Overweging en advies

7.1 Classificatie TOSV en SFSV

TOSV en SFSV worden overgedragen door zandvliegen en veroorzaken in hun verspreidingsgebieden 'zandvliegkoorts' bij mensen. TOSV en SFSV infecties verlopen doorgaans asymptomatisch tot mild. Er zijn echter ook enkele gevallen gerapporteerd waarbij infectie met TOSV leidde tot ernstige ziektegevallen, waarvan één met dodelijke afloop. TOSV en SFSV komen net als hun vectoren, voor zover bekend niet van nature voor in Nederland. Om deze reden is de kans dat deze virussen zich in het Nederlandse milieu kunnen verspreiden verwaarloosbaar klein.

Op basis van de mogelijke transmissieroutes en gezien het feit dat TOSV en SFSV hoofdzakelijk geassocieerd zijn met milde ziektegevallen, is de COGEM van oordeel dat deze virussen ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kunnen worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.

7.2 Inschaling werkzaamheden

De aanvrager is voornemens de gehele genoomsequentie van TOSV en SFSV te transfacteren in animale cellen, waardoor volvirulent gg-TOSV en gg-SFSV wordt geproduceerd. Er zullen hierbij geen sequenties van verschillende phlebovirussen worden gecombineerd.

Gezien de indeling van TOSV en SFSV in pathogeniteitsklasse 2 en op basis van de bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM om de *in vitro* werkzaamheden met gg-TOSV en gg-SFSV op ML-II inperkingsniveau in te schalen.

Indien de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.

8. Signalering

Om de kans op besmetting van de medewerker via wondjes te minimaliseren stelt de aanvrager voor om bij de voorgenomen werkzaamheden de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw gedragen.

De COGEM signaleert dat deze maatregelen vanuit ARBO-overwegingen worden opgelegd om de kans op besmetting van de medewerker via wondjes te minimaliseren, aangezien de kans op verdere verspreiding van de virussen verwaarloosbaar klein is. Omdat de kans op besmetting van de medewerker via verwondingen van de huid het grootst is bij prik- of snijincidenten, doet de COGEM de aanbeveling om handelingen met 'sharps' tot een minimum te beperken en alleen in combinatie met kevlarhandschoenen uit te voeren.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 23 mei 2018)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/205/bunyaviridae (bezocht: 18 mei 2018)
3. Tufan Z *et al.* (2013). Sandfly fever: a mini review. *Viol. Mycol.* 2: 109 doi:10.4172/2161-0517.1000109
4. Ayhan N & Charrel RN (2017). Of phlebotomines (sandflies) and viruses: a comprehensive perspective on a complex situation. *Curr. Opin. Insect Sci.* 22: 117-124
5. Alkan C *et al.* (2017). Isolation and sequencing of Dashli virus, a novel Sicilian-like virus in sandflies from Iran; genetic and phylogenetic evidence for the creation of one novel species within the Phlebovirus genus in the Phenuiviridae family. *PLoS negl. Trop. Dis.* 11: e0005978. doi: 10.1371/journal.pntd.0005978
6. Charrel RN *et al.* (2005). Emergence of Toscana Virus in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1657-1663
7. European centre for disease prevention and control. Phlebotomine sand flies - Factsheet for experts. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies> (bezocht: 22 mei 2018).
8. European centre for disease prevention and control. *Phlebotomus papatasi* - current known distribution: January 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-papatasi-current-known-distribution-january-2018> (bezocht: 23 mei 2018)
9. European centre for disease prevention and control. *Phlebotomus papatasi* - current known distribution: January 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perfiliewi-current-known-distribution-january-2018> (bezocht: 23 mei 2018)
10. European centre for disease prevention and control. *Phlebotomus papatasi* - current known distribution: January 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-paniculatus-current-known-distribution-january-2018> (bezocht: 23 mei 2018)

11. Alkan C *et al.* (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral. Res.* 100: 54-74
12. Moriconi M *et al.* (2017). Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005660. doi: 10.1371/journal.pntd.0005660
13. Howell BA *et al.* (2015). Toscana virus encephalitis in a traveler returning to the United States. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1445-1447
14. Veater J *et al.* (2017). Toscana virus meningo-encephalitis: an important differential diagnosis for elderly travellers returning from Mediterranean countries. *BMV Geriatr.* 17: 193
15. Kuhn J *et al.* (2005). Toscana virus causing severe meningoencephalitis in an elderly traveller. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76: 1605-1606
16. Baldelli F *et al.* (2004). Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 38: 515-520
17. Dionisio D *et al.* (2001). Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype toscana. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1241-1243
18. Schwarz TF *et al.* (1995). Aseptic meningitis caused by sandfly fever virus, serotype Toscana. *Clin. Infect. Dis.* 21: 669-671
19. Martinez-Garcia FA *et al.* (2008). Deafness as a sequela of Toscana virus meningitis. *Med. Clin.* 130: 639 [in Spanish]
20. Serata D *et al.* (2011). Personality changes after Toscana virus (TOSV) encephalitis in a 49-year-old man: A case report. *Int. J. Neurosci.* 121: 165-169
21. Sanbonmatsu-Gómez S *et al.* (2009). Unusual manifestation of toscana virus infection, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 347-348
22. Bartels S. *et al.* (2012). Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J. Neurol.* 259: 175-177
23. Kocak Tufan Z *et al.* (2011). Clinical and laboratory findings of a sandfly fever Turkey Virus outbreak in Ankara. *J. Infect.* 63: 375-381
24. Carhan A *et al.* (2010). Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. *J. Clin. Virol.* 48: 264-269
25. Ergunay K *et al.* (2012). A case of central nervous system infection due to a novel Sandfly Fever Virus (SFV) variant: Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV). *J. Clin. Virol.* 54: 79-82
26. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
27. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Rift Valley fever virus (RVFV). COGEM advies CGM/080313-05
28. COGEM (2013). Inschaling werkzaamheden met gg-Huaiyangshan virus. COGEM advies CGM/130502-01
29. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02

30. 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.
31. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BAUA). Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe 462. https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?__blob=publicationFile (bezocht: 18 mei 2018)
32. Health and Safety Executive. The Approved List of biological agents. <http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf> (bezocht: 18 mei 2018)
33. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid (WIV-ISP). https://www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_virus.pdf (bezocht: 18 mei 2018)
34. Federal Office for the Environment (FOEN). Classification of Organisms. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht: 18 mei 2018)