

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 13 januari 2020
KENMERK CGM/200113-01
ONDERWERP Advies 'Inschaling van werkzaamheden met reassortanten SHUV en SBV'

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 16-250_III-006 getiteld 'Arbovirussen van pathogeniteitsklasse III', ingediend door Stichting Wageningen Research, deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een aanvraag voor werkzaamheden met chimere virussen (reassortanten) gebaseerd op de oudervirussen Schmallerberg virus (SBV) en Shuni virus (SHUV). Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is om te onderzoeken of reassortanten van SBV en SHUV replicatie-competent zijn. Tevens wil de aanvrager het tropisme van de reassortanten *in vitro* in cellijnen, primaire cellen en weefselexplantaten onderzoeken.

Het is niet uitgesloten dat bij de werkzaamheden een reassortant virus met een veranderde fitness ontstaat, dat door de in Nederland aanwezige knutten of muggen verspreid kan worden. Aangezien de aanvrager niet voornemens is om experimenten uit te voeren met dieren (zoals hoefdieren, muggen of knutten), is het uitgesloten dat reassortanten via de natuurlijke verspreidingsroute uit het laboratorium kunnen ontsnappen.

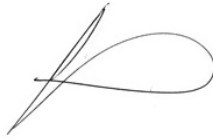
Beide virussen zijn strikte dierpathogenen van pathogeniteitsklasse 2. Geen van de aan SBV en SHUV verwante virussen infecteren of veroorzaken ziekte bij de mens. De COGEM is van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat een reassortant virus met zoönotisch potentieel ontstaat, dat via bijvoorbeeld een door een prikincident geïnfecteerde medewerker in het milieu verspreid wordt.

De aanvrager heeft verzocht om de voorgenomen werkzaamheden op ML-III te mogen uitvoeren. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu hierbij verwaarloosbaar klein, maar merkt op dat de veiligheid voor mens en milieu ook gewaarborgd is indien de werkzaamheden op ML-II plaatsvinden.



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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden prof. dr. J. Kortekaas en dr. B.P. H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met reassortanten van het Shuni virus en het Schmallerberg virus

COGEM advies CGM/200113-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een wijzigingsverzoek van Wageningen Research (IG 16-250) is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met chimere virussen (reassortanten) gebaseerd op het Shuni virus (SHUV) en het Schmallerberg virus (SBV). De aanvrager is voornemens om reassortanten te maken, en in cellijnen, primaire cellen en weefselexplantaten te onderzoeken of de reassortanten replicatiecompetent zijn en of het tropisme veranderd is. De geïmmortaliseerde cellijnen zijn vervaardigd met behulp van een VSV-G gepseudotyperde 3^e generatie lentivirale vector, en commercieel verkrijgbaar. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-III te mogen uitvoeren.

2. Orthobunyavirussen

Schmallerberg virus (SBV) en Shuni virus (SHUV) behoren beide tot het genus *Orthobunyavirus* van de familie *Peribunyaviridae*.^{1,2} Het genus *Orthobunyavirus* bevat 88 virusspecies (en meer dan 170 verschillende virussen). Alle orthobunyavirussen zijn arbovirussen en voor hun transmissie afhankelijk van geleedpotigen, zoals muggen, knutten, bedwantsen en teken.³ De virussen infecteren en repliceren in hun vectoren. Ook transovariële transmissie is beschreven. Orthobunyavirussen infecteren een breed scala aan gewervelde dieren, zoals de mens, hoefdieren, konijnen of vogels. De meeste virussen worden door een beperkte reeks vectoren overgedragen.⁴ Verschillende orthobunyavirussen veroorzaken ernstige ziekten in de mens waaronder La Crosse virus, Bunyamwera virus, Oropouche virus en Ngari virus.

De virusdeeltjes van orthobunyavirussen zijn omgeven door een membraan. De virussen hebben een negatief strengs RNA genoom, dat uit drie segmenten bestaat: het *small* (S), *medium* (M) en *Large* (L) segment. Het S-segment codeert voor het nucleocapside eiwit (N). Dit eiwit vormt samen met de RNA genoomsegmenten het zogenaamde 'nucleocapside'. Daarnaast codeert het S segment voor het niet-structureel eiwit NSs. Dit eiwit is een belangrijke virulentiefactor omdat het de antivirale respons van de gastheer remt. Het M-segment codeert voor de glycoproteïnen Gn en Gc, en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, en zorgen voor de binding van het virus aan de cel. Deze oppervlakte-eiwitten bevatten vermoedelijk belangrijke virulentie-determinanten. Het L-segment codeert voor het virale RNA polymerase (L-eiwit). De 'untranslated regions' (UTRs) aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.

Binnen het genus *Orthobunyavirus* kunnen 18 serogroepen onderscheiden worden.⁵ SHUV en SBV behoren tot de zogenaamde Simbu-serogroep van orthobunyavirussen. Deze serogroep bestaat uit ca 30 virussen en kan verdeeld worden in twee subgroepen (*subclades*), bestaande uit zeven viruscomplexen. SHUV (SHUV-complex) en SBV (Akabane-complex) behoren tot subclade B. Verschillende virussen

die tot subclade A behoren, veroorzaken ziekten bij de mens. Subclade B virussen veroorzaken voor zover bekend geen ziekten bij de mens of non-humane primaten, maar verschillende van deze virussen veroorzaken wel economisch belangrijke ziekten in vee.

2.1 *Schmallenbergvirus*

SBV behoort tot de species *Schmallenberg orthobunyavirus*. De andere virussen binnen dit species zijn: Douglas virus (DOUV), Sathuperi virus (SATV) en Shamonda virus (SHAV). Alle vier de virussen binnen het species zijn dierpathogenen die onder meer runderen infecteren.

SBV infecteert hoefdieren, zoals runderen, schapen, geiten en herten.⁶ Infectie met het SBV geeft bij volwassen dieren over het algemeen milde symptomen zoals koorts, diarree en verminderde melkproductie bij runderen.⁷ Bij volwassen schapen en geiten leidt infectie meestal tot een asymptomatische infectie, die al dan niet gepaard gaat met diarree. Infectie tijdens de dracht kan echter leiden tot misvormingen van de ledematen en hersenen met vroeg- en doodgeboorten tot gevolg.⁸ Er zijn in Europa vaccins commercieel verkrijgbaar.⁹ Het virus wordt overgedragen door knutten (*Culicoides* spp.).^{10,11,12}

Het virus is enzoötisch in Nederland en Europa. Uit serologisch onderzoek blijkt dat het merendeel van de Nederlandse veestapel een SBV-infectie heeft doorgemaakt.¹³ Meer dan 60% van de melkkoeien en 95% van de andere volwassen koeien, 85% van de schapen, en 50% van de geiten in Nederland hebben een infectie met het SBV doorgemaakt. Daarnaast is de kudde-immuniteit bij niet-melkkoeien en schapen groter dan 95%, bij melkkoeien 80% en bij geiten groter dan 70%.¹⁴

Er zijn geen aanwijzingen dat het virus overdraagbaar is op de mens en bij de mens tot ziekteverschijnselen kan leiden.¹⁵ In een onderzoek uitgevoerd in 2012 werd geen seroconversie aangetoond onder 300 veeartsen en bewoners van getroffen bedrijven.¹⁶

2.2 *Shunivirus*

SHUV behoort tot de species *Shuni orthobunyavirus*. De andere virussen binnen het species zijn Aino virus (AINOV) en Kaikalur virus (KAIV).^{1,2} De drie virussen infecteren onder meer vee, schapen en geiten.¹⁷

SHUV is aangetroffen in Afrika in vee, zoals runderen, paarden, geiten, schapen, en wilde dieren waaronder rinoerossen en krokodillen. De prevalentie is vooral hoog onder runderen. Oorspronkelijk werd gedacht dat infecties asymptomatisch verlopen, maar in 2012 is gerapporteerd dat het virus koorts en neurologische symptomen zoals ataxie, stuiptrekkingen en gedeeltelijke verlamming veroorzaakt in paarden in Zuid-Afrika.¹⁸ Later is ook gerapporteerd dat infecties bij schapen in Israël leiden tot abortus, doodgeboortes en misvormingen.^{19,20} Verspreiding van het virus vindt plaats via knutten (*Culicoides* spp) en muggen (*Culex theileri*).²¹

In 2012 was er slechts één geval beschreven waarbij er antilichamen tegen SHUV in de mens waren aangetoond. Dit betrof een kind met koorts in 1966.²² In 2014 is gerapporteerd dat in 5 van 123 geteste veeartsen in Zuid-Afrika, antilichamen tegen SHUV konden worden aangetoond.²³

3. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft SHUV in 2013 als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.²⁴ SBV is in 2012 kort na de uitbraak in West-Europa door de COGEM uit voorzorg als klasse 3 dierpathogeen ingeschaald.²⁵ In 2013 heeft de COGEM de classificatie van SBV heroverwogen en als strikt dierpathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁶

In 2014 heeft de COGEM geadviseerd om *in vitro* laboratoriumwerkzaamheden met dierpathogene arbovirussen die in pathogeniteitsklasse 3 zijn ingedeeld in te schalen op ML-II.²⁷ De COGEM is van oordeel dat op dat inperkingsniveau en onder de daarbij geldende werk- en inrichtingsvoorschriften de veiligheid voor mens en milieu afdoende is gewaarborgd, gezien de afwezigheid van de vectoren die noodzakelijk zijn voor verspreiding van deze virussen.

4. Overwegingen

De aanvrager is voornemens reassortanten met alle drie de genoomsegmenten van SBV en SHUV te maken en te onderzoeken of deze replicatie-competent zijn. Tevens zal een mogelijk veranderde virulentie en weefseltropisme onderzocht worden met behulp van (geïmmortaliseerde) cellijnen, primaire cellen en weefselexplantaten. Productie van de reassortanten zal plaatsvinden door BSR-T7 cellen die het T7 polymerase tot expressie brengen, te transfacteren met plasmiden die coderen voor de drie genoomsegmenten L, M en S en onder de controle staan van de T7 promotor. De aanvrager is niet voornemens om werkzaamheden met hoefdieren of geleedpotigen/insecten (zoals muggen of knutten) uit te voeren.

4.1 SBV en SHUV

De COGEM heeft SBV en SHUV als klasse 2 dierpathogenen ingeschaald in respectievelijk 2012 en 2013. In 2014 is een publicatie verschenen, waarin gerapporteerd werd dat in 5 van 123 geteste veeartsen in Zuid-Afrika antilichamen tegen SHUV konden worden aangetoond.²³ De COGEM merkt op dat deze publicatie onvoldoende aanleiding geeft om te veronderstellen dat het virus daadwerkelijk mensen kan infecteren. Het aantal seropositieve mensen (4 %) is laag, de kans op kruis-reacties met serologisch verwante virussen is groot, en blootstelling aan het virus betekent nog niet dat er infectie en replicatie heeft plaatsgehad. Daarnaast zijn er geen publicaties over ziekte bij mensen veroorzaakt door SHUV.

Alles in overweging nemende ziet de COGEM geen aanleiding om haar eerdere classificatie van SBV en SHUV te herzien, en adviseert zij om de classificatie als klasse 2 strikt dierpathogeen te handhaven.

4.2 Reassortanten

Uitwisseling van genoomsegmenten speelt een belangrijke rol in de evolutie van (ortho)bunyavirussen.²⁸ Co-infecties van orthobunyavirussen gevolgd door uitwisseling van genoomsegmenten is zowel

beschreven onder laboratoriumcondities als onder natuurlijke omstandigheden.²⁹ Muggen en knutten zijn een belangrijk reservoir voor het optreden van *reassortment*. Door uitwisseling van genomsegmenten kunnen nieuwe virussen ontstaan met een verhoogde fitness die mogelijk virulenter of pathogener zijn voor bepaalde gastheren. Voor SBV is gesuggereerd dat het een reassortant is tussen het M-segment SATV en de S en L-segmenten van SHAV.³⁰ Later is echter gesteld dat SBV juist een voorouder is van SHAV, dat zou ontstaan zijn uit de L en S-segmenten van SBV en het M-segment van een onbekend virus.³¹

4.3 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens reassortanten te maken tussen SBV en SHUV. De natuurlijke verspreidingsgebieden van deze virussen lijken geografisch gescheiden. Het is niet uitgesloten dat een reassortant tot een nieuw virus leidt met een veranderde fitness, dat door de in Nederland aanwezige knutten en of muggen verspreid kan worden. Aangezien de aanvrager niet voornemens is om experimenten uit te voeren met dieren zoals hoefdieren of insecten (muggen, knutten) is het uitgesloten dat reassortanten via de natuurlijke verspreidingsroute uit de ingeperkte ruimte kunnen ontsnappen.

Beide virussen zijn strikte dierpathogenen die een breed en overlappend scala aan 'hoefdieren' infecteren. Geen van de aan SBV en SHUV verwante virussen infecteren of veroorzaken ziekte bij de mens. Beide virussen behoren tot de zogenaamde subclade B van orthobunyavirussen. Geen van de subclade B virussen infecteert de mens. Gezien het bovenstaande acht de COGEM de kans zeer klein tot verwaarloosbaar klein dat door de voorgenomen werkzaamheden een virus ontstaat met zoönotisch potentieel.

Een medewerker zou zich kunnen infecteren met een reassortant via een prikincident. Aerogene transmissie van orthobunyavirussen is, zover bij de COGEM bekend, nooit beschreven. Echter bij werkzaamheden onder laboratoriumomstandigheden, waarbij gewerkt wordt met zeer hoge concentraties virus, kan aerogene transmissie onder uitzonderlijke omstandigheden, in theorie niet volledig uitgesloten worden. De COGEM merkt op dat, als een medewerker door een incident blootgesteld wordt aan het virus, het onwaarschijnlijk is dat deze daadwerkelijk geïnfecteerd wordt gezien de kleine tot verwaarloosbare kans op een zoönotische reassortant. Verder is de COGEM van oordeel dat, zelfs in het geval dat een medewerker een infectie oploopt, de kans op verdere verspreiding verwaarloosbaar klein is, omdat daarvoor muggen of knutten aanwezig moeten zijn die het virus kunnen overdragen. Daarnaast zouden deze insecten ook nog eens de geïnfecteerde medewerker tijdens de viremische periode moeten prikken.

5. Advies

De aanvrager heeft verzocht om de voorgenomen werkzaamheden op ML-III te mogen uitvoeren. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden op ML-III plaatsvinden. De COGEM merkt op dat gezien de aard en pathogeniteitsklasse van de oudervirussen en haar eerdere advies over werkzaamheden met

pathogeniteitsklasse 3 arbovirussen, de veiligheid voor mens en milieu ook gewaarborgd is indien de werkzaamheden op ML-II plaatsvinden.

De COGEM is van oordeel dat er geen verdere inperkingsmaatregelen op ML-II of ML-III noodzakelijk zijn. Ze signaleert dat het vanuit ARBO-overwegingen overwogen kan worden om werkzaamheden met *sharps* te vermijden, om ook het theoretische risico van blootstelling van de medewerker te voorkomen.

Referenties

1. Holly R. Hughes HR *et al.* & the ICTV Report Consortium (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Peribunyaviridae*, J. Gen. Virol. (In Press).
2. Maes P *et al.* (2018). Taxonomy of the family *Arenaviridae* and the order *Bunyavirales*: update 2018. Arch. Virol. 163: 2295 -2310
3. Elliot MR (2014). Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. Nat. Rev. Microbiol. 12: 673-685
4. Beaty BJ & Calisher CH (1991). *Bunyaviridae*--natural history. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 169: 27-78
5. Wang J *et al.* (2010). Evolutionary history of Simbu serogroup orthobunyaviruses in the Australian epizootic. Virol. 535: 32-44
6. Doceul V *et al.* (2013). Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. Vet. Res. 44: 31-44
7. Muskens J *et al.* (2012). Diarrhea and loss of production on Dutch dairy farms caused by the Schmallenberg virus. Tijdschr. Diergeneeskd. 137:112-5
8. Brom van den R *et al.* (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. Tijdschr. Diergeneeskd. 137: 106-111
9. Endalew AD *et al.* (2019). Schmallenberg Disease - A Newly Emerged Culicoides-Borne Viral Disease of Ruminants. Viruses 11: 1065. doi:10.3390/v11111065
10. Rasmussen LD *et al.* (2012). Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. Emerg. Infect. Dis. 18: 1204–1206
11. De Regge N *et al.* (2012). Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. Transboundary Emerg. Dis. 59: 471-475
12. Elbers ARW *et al.* (2013). Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. Emerg. Infect. Dis. 19:106-109
13. Veldhuis AM *et al.* (2013). Schmallenberg virus epidemic in the Netherlands: Spatiotemporal introduction in 2011 and seroprevalence in ruminants. Prev. Vet. Med. 112: 35-47
14. Elbers ARW *et al.* (2012). Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011–2012. Emerg. Infect. Dis. 18: 1065-1071
15. Reusken C *et al.* (2012). Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. Emerg. Infect. Dis. 18: 1746-1754

16. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (2012). Serosurvey to assess zoonotic transmission of Schmallenberg virus in farmers and veterinarians in the Netherlands. www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:120203&type=org&disposition=inline (22-08-2012)
17. Rodrigues FM *et al.* (1977). Kaikalur virus--a new arthropod-borne virus belonging to the Simbu group isolated in India from *Culex tritaeniorhynchus* (Giles). *Indian J. Med. Res.* .66: 719-725
18. Van Eeden C *et al.* (2012). Shuni virus as cause of neurologic disease in horses. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 318-321
19. Golender N *et al.* (2015) Malformations caused by Shuni virus in ruminants, Israel, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 2267-2268
20. Golender N *et al.* (2019). Shuni virus in Israel: Neurological disease and fatalities in cattle. *Transbound Emerg Dis.* 66: 1126-1131
21. Möhlman TWR *et al.* (2019). Vector competence of biting midges and mosquitoes for Shuni virus. *Vector competence of biting midges and mosquitoes for Shuni virus. PLoSNegl. Trop. Dis.* 12(12):e0006993
22. Moore DL *et al.* (1975). Arthropod-borne viral infections in man in Nigeria: 1964–1970. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69: 49–64
23. Van Eeden C *et al.* (2014). Antibodies against West Nile and Shuni viruses in veterinarians, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 1409-1410
24. COGEM (2013). Shuni virus reverse-genetics. COGEM advies CGM/130919-01
25. COGEM (2012). Advies inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Schmallenbergvirus. COGEM advies CGM/120829-02
26. COGEM (2013). Classificatie van humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02
27. COGEM (2014). Omlaagschaling van *in vitro* laboratoriumwerkzaamheden met dierpathogene arbovirussen. COGEM advies CGM/140630-01
28. Briese T *et al.* (2013). Viruses of the family *Bunyaviridae*: are all available isolates reassortants? *Virology*. 446:207-216.
29. Coupeau D *et al.* (2019). Host-dependence of *in vitro* reassortment dynamics among the Sathuperi and Shamonda Simbuviruses, *Emerg. Microb. Infect.* 8: 381-395
30. Yanase T *et al.* (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch. Virol.* 157: 1611-1616.
31. Goller KV *et al.* (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1644–1646.