

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

DATUM 12 februari 2020
KENMERK CGM/200212-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van het *Flock House virus*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Flock House virus' (IG 20-015_2.13-000), ingediend door Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het *Flock House virus* (FHV). Tevens is de COGEM gevraagd of dit virus als insect-specifiek beschouwd kan worden.

FHV is geïsoleerd uit een kever in Nieuw-Zeeland. Het virus kan door fruitvliegen en muggen opgenomen worden via het voedsel, en kan in deze insecten repliceren zonder dat er ziekteverschijnselen optreden. In cellijnen van fruitvliegen kan het virus een samenklontering van cellen veroorzaken.

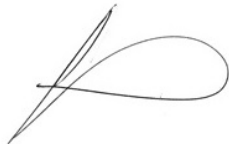
Naast insecten kan het virus ook repliceren in nematoden, planten, gisten en zoogdiercellen. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat nematoden, vertebraten (waaronder de mens), of planten op natuurlijke wijze met dit virus geïnfecteerd kunnen worden. Voor zover bij de COGEM bekend, is FHV niet geassocieerd met ziekte bij andere diersoorten of planten.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het *Flock House virus* als insect-specifiek virus gekenmerkt kan worden en daarmee als strikt dierpathogeen ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kan worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.



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

Pathogeniteitsclassificatie van het *Flock House virus* (FHV)

COGEM advies CGM/200212-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag getiteld 'Flock House virus' (IG 20-015) van de Universiteit Utrecht, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het *Flock House virus* en voor plaatsing van deze virussoort in Bijlage 4 van de Regeling ggo.¹ Tevens is de COGEM gevraagd of dit virus als insect-specifiek beschouwd kan worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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.

2.1 Strikt dierpathogene virussen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.² 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.³ De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische 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.

2.2 Insect-specifieke virussen

De COGEM heeft de afgelopen jaren verschillende insect-specifieke virussen als strikt dierpathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Gezien de toename aan onderzoek met insectenvirussen, heeft de COGEM in 2019 een onderzoeksproject te laten uitvoeren om insect-specifieke virussen generiek te classificeren, analoog aan de klasse 2 indeling van plantenvirussen. In het uitgevoerde onderzoek zijn een aantal insect-specifieke taxa geïdentificeerd waarbij een duidelijke afbakening is gemaakt tussen zogenaamde ‘arthropod borne viruses’ (arbovirussen) en insect-specifiek virussen.⁴ Op grond van de aard van insect-specifieke virussen, die uitsluitend insecten kunnen infecteren, heeft de COGEM geadviseerd om alle insect-specifieke virussen als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.⁵

3. Flock House virus

Het *Flock House virus* (FHV) is een virusspecies behorende tot het genus *Alphanodavirus*, en de familie *Nodaviridae*. In de familie *Nodaviridae* worden twee genera onderscheiden, het *Alphanodavirus* en *Betanodavirus*. Betanodavirussen staan bekend om het infecteren van vissen. Alphanodavirussen zijn uit insecten geïsoleerd en infecteren insecten, maar van één species uit dit genus (*Nodamura virus*) zijn aanwijzingen dat het een arbovirus is en ook bepaalde vertebraten kan infecteren en doden.^{6,7,8,9} Er is ook een gerelateerde groep virussen die *Caenorhabditis* nematoden infecteren, maar deze zijn nog niet door de ICTV als aparte familie toegekend.¹⁰ Van nodavirussen is bekend dat zij kunnen repliceren in cellen van planten, insecten en zoogdieren.¹¹

FHV heeft een enkelstrengs positief RNA genoom, bestaande uit twee RNA segmenten.¹² Het eerste RNA segment, RNA1, kan autonoom repliceren in afwezigheid van RNA2 en codeert onder andere voor het virale RNA-afhankelijke RNA polymerase. RNA2, dat codeert voor het structurele manteleiwit (capside), is afhankelijk van aanwezigheid van RNA1 voor replicatie.¹³ Na infectie wordt ook een derde (subgenomisch) RNA segment geproduceerd, RNA3, dat niet in het uiteindelijke virusdeeltje terecht komt. RNA3 codeert voor twee kleine eiwitten, B1 en B2. De functie van het B1 eiwit is onbekend, maar van het eiwit B2 is bekend dat het als suppressor van RNA interference (RNAi) kan fungeren.^{6,14,15}

FHV is oorspronkelijk geïsoleerd uit de keversoort *Costelytra zealandica*.¹⁶ Hoewel de kevers waaruit het virus is geïsoleerd nog leefden, vertoonden deze wel afwijkingen in hun ontwikkeling.¹⁷ Uit experimenten waarbij de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* FHV via het eten binnenkeeg, bleek dat FHV fruitvliegen kan infecteren.¹⁸ De geïnfecteerde fruitvliegen leefden net zo lang als ongeïnfecteerde fruitvliegen. In *Drosophila* cellijnen veroorzaakt FHV een cytopatisch effect (CPE), niet zozeer door cytolyse, maar door het samenklonteren van cellen.¹⁷

Naast replicatie van FHV in *Drosophila*, is replicatie van het virus ook onderzocht en waargenomen na infectie van verschillende medisch-relevante insectensoorten door middel van injectie met FHV, of een bloedmaal met FHV. Het betrof muggen uit vier verschillende genera (*Culex*, *Armigeres*, *Aedes* en *Anopheles*), tsetsee vliegen (*Glossina morsitans*) en *Rhodnius prolixus*, de vector van de Chagas parasiet.^{19,20} In de muggensoorten *Aedes aegypti*, *Culex pipiens pipiens*, en *Armigeres subalbatus* zijn geen ziekteverschijnselen waargenomen bij toegediende doseringen tot 10^7 plaque forming units (pfu). Bij doseringen hoger dan 10^4 pfu of accumulerende titers van 10^8 pfu was FHV dodelijk voor insecten uit de genera *Anopheles* en *Glossina*. Sterfte bij *R. prolixus* is alleen waargenomen tijdens de eerste 4 nimfstadia bij een toediening van $2,4 \times 10^5$ pfu (100% bij eerste twee stadia, 40-50% bij derde en vierde stadium), maar niet bij het vijfde of volwassen stadium.¹⁹

FHV kan naast insecten ook repliceren in zoogdiercellen, nematoden, planten en gisten.^{6,21} Expressie van FHV RNA1 en RNA2 vanaf een plasmide ingebracht in 'baby hamster kidney' (BHK) cellen leidde tot replicatie van het RNA en productie van infectieus virus dat plaques veroorzaakt in *Drosophila* cellen. Hierbij werd opgemerkt dat het virus zelf niet in staat was deze cellen te infecteren, en virusdeeltjes niet door de BHK cel cultuur konden verspreiden.²²

In nematoden waarbij expressie van chromosomaal geïntegreerde DNA kopieën van RNA1 en RNA2 is onderzocht, bleek zelf-replicatie van het RNA1 en *in trans* replicatie van RNA2 mogelijk.¹³ Beide RNA's bleken biologisch actief na transfectie in een *Drosophila* S2 cellijn.

In planten geïnoculeerd met FHV RNA zijn FHV virusdeeltjes geproduceerd in de geïnoculeerde bladeren van o.a., *Hordeum vulgare* (Gerst), *Chenopodium hybridum* (Esdoornzanzenvoet), *Vigna sinensis*, en *Nicotiana benthamiana*. In de geïnoculeerde planten werden geen symptomen van pathogeniteit waargenomen. In sommige gevallen was het geproduceerde virus (geïsoleerd uit de plant) in staat plaques te vormen in *Drosophila* cellen.²³ In *N. benthamiana* zijn ook lage hoeveelheden virusdeeltjes gedetecteerd in bladeren die niet geïnoculeerd werden, waarschijnlijk door transport na synthese in de geïnoculeerde bladeren. In het artikel wordt opgemerkt dat FHV niet als plantenvirus

aangemerkt moet worden, omdat het geen natuurlijke route voor infectie heeft in planten, en dat virus synthese op andere plaatsen dan waar het RNA geïnoculeerd is, zeer onwaarschijnlijk is.²³

Transfectie van FHV RNA in gist (*Saccharomyces cerevisiae*) resulteerde eveneens in de productie van virusdeeltjes die *Drosophila* cellen konden infecteren.²⁴ De hoeveelheid geproduceerde virusdeeltjes was vergelijkbaar met productie bij gebruik van *Drosophila* cellijnen.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over FHV, of andere species in het genus *Aphanodavirus*. Wel heeft zij in 2017 advies uitgebracht over verschillende visvirussen uit het genus *Betanodavirus*.²⁵

5. Overweging en advies

FHV is geïsoleerd uit kevers die voorkomen op het Noordereiland van Nieuw Zeeland. Vanwege het kleine genoom (ongeveer 4,5 kb) en de groeikarakteristieken van het virus, wordt het ook wel als modelsysteem gebruikt om onder andere de mechanismen van RNA virus replicatie te onderzoeken. De wijze waarop verspreiding van FHV plaatsvindt, is niet geheel duidelijk. Onder experimentele condities is gebleken dat FHV in fruitvliegen en muggen opgenomen kan worden via het voedsel. Daarnaast blijkt uit verschillende studies dat replicatie van het virus niet alleen in insecten kan plaatsvinden, maar ook in cellen van planten, nematoden, zoogdieren en in gisten.

De kevers waaruit het virus is geïsoleerd vertoonden een achterstand in de ontwikkeling. Of deze achterstand te wijten was aan infectie met het virus is echter niet duidelijk. In *Drosophila* cellijnen kan het virus een CPE veroorzaken, hoofdzakelijk door samenklontering van cellen. In studies waarbij FHV geïnoculeerd is in andere soorten insecten, werden geen ziekteverschijnselen waargenomen. Voor insecten uit de genera *Anopheles* en *Glossina* bleken hoge doseringen van het virus dodelijk. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat nematoden, vertebraten (waaronder de mens), of planten op natuurlijke wijze met dit virus geïnfecteerd kunnen worden. Voor zover bij de COGEM bekend, is FHV in de wetenschappelijke literatuur niet geassocieerd met ziekte bij andere diersoorten of planten. FHV veroorzaakt geen CPE in zoogdiercellen en wordt in de wetenschappelijke literatuur niet beschouwd als een humaan pathogeen.²⁰

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *Flock House virus* als insect-specifiek virus gekenmerkt kan worden. De COGEM adviseert derhalve om FHV als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en te plaatsen op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht: 29 januari 2020)
2. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
3. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02

4. Vlak J (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. COGEM onderzoeksrapport CGM 2019-01
5. COGEM (2019). Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus: Alphanodavirus. ICTV Virus Taxonomy, The Online (10th) Report of the ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/nodaviridae/1001/genus-alphanodavirus (bezocht: 3 februari 2020)
7. Scherer WF & Hurlbut HS (1967). Nodamura virus from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *Am. J. Epidemiol.* 86: 271-285
8. Ball LA *et al.* (1992). Replication of nodamura virus after transfection of viral RNA into mammalian cells in culture. *J. Virol.* 66: 2326-2334
9. Garzon S *et al.* (1990). Implication of mitochondria in the replication of Nodamura virus in larvae of the Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice. *Arch. Virol.* 113: 165-176
10. Félix MA & Wang D (2019). Natural Viruses of *Caenorhabditis* Nematodes. *Annu. Rev. Genet.* 53: 313-326
11. Jiwaji M *et al.* (2019). Providence virus: An animal virus that replicates in plants or a plant virus that infects and replicates in animal cells? *PLoS One.* 14: e0217494
12. Friesen PD (2013). Insect viruses. Nodaviridae. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
13. Lu R *et al.* (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436: 1040-1043
14. Odegard A *et al.* (2010). Flock House virus: A model system for understanding non-enveloped virus entry and membrane penetration. In: *Cell entry by non-enveloped viruses. Current topics in microbiology and Immunity.* Ed. Johnson JE, La Jolla California
15. Schuster S *et al.* (2019). Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. *Viruses*, 11:448
16. Dearing SC *et al.* (1980). A small RNA virus isolated from the grass grub, *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 7: 267-269
17. Scotti PD *et al.* (1983). Flock House virus: A nodavirus isolated from *Costelytra zealandica* (white) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Archives of Virology*, 75: 181-189
18. Goic B *et al.* (2013). RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nature Immunology* 14: 396-403
19. Dasgupta R *et al.* (2007). Replication of Flock House virus in three genera of medically important insects. *J. Med. Entomol.* 44: 102-110
20. Dasgupta R *et al.* (2003). Flock House virus replicates and expresses green fluorescent protein in mosquitoes. *Journal of General Virology*, 84: 1789-1797
21. Yong CY *et al.* (2017). Advances in the study of nodavirus. *PeerJ.* 5: e3841
22. Ball A (1995). Requirements for the self-directed replication of Flock House virus RNA1. *J. Virol.* 69: 720-727

23. Selling BH *et al.* (1990). Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 434-438
24. Price BD *et al.* (1996). Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9465-9470
25. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van negen visvirussen. COGEM advies CGM/170322-02