

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

| | |
|------------------|---|
| DATUM | 23 augustus 2021 |
| KENMERK | CGM/210823-02 |
| ONDERWERP | Advies Pathogeniteitsclassificatie van <i>Bombyx mori</i> latent virus en Chronic bee paralysis virus |

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de pathogeniteitsklasse van *Bombyx mori* latent virus en Chronic bee paralysis virus (IG 21-139_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Bombyx mori* latent virus (BmLV) en Chronic bee paralysis virus (CBPV), en voor de plaatsing van deze virussen op Bijlage 4 van de Regeling ggo.

BmLV is een positief-strengs RNA virus dat in 2005 is ontdekt in cellen van de zijderups, *Bombyx mori*. Cellen van de zijderups die geïnfecteerd zijn vertonen geen ziekteverschijnselen. Ook de larven van de zijderups die geïnfecteerd worden vertonen geen infectieverschijnselen, terwijl het virus wel in de weefsels aanwezig blijft. BmLV kan geen cellen infecteren die afkomstig zijn van andere dieren of van de mens.

CBPV is ook een positief-strengs RNA virus en heeft een gesegmenteerd genoom dat bestaat uit twee RNA strenges. Het virus is in 1963 ontdekt en veroorzaakt wereldwijd een dodelijke ziekte in de honingbij. Geïnfecteerde honingbijen raken chronisch verlamd en worden trillerig, kruipen over de grond en kunnen ook hun haren verliezen, waardoor ze er zwart-glimmend uitzien en verstoten worden door de gezonde bijen in de kolonie.

Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die BmLV of CBPV in verband brengen met pathogeniteit voor planten of vertebraten, waaronder de mens. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat BmLV en CBPV als insect-specifieke virussen gekenmerkt kunnen worden. Derhalve adviseert de COGEM om beide virussen als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.



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 eventuele belangenverstremeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie van *Bombyx mori latent virus* en Chronic bee paralysis virus

COGEM advies CGM/210823-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van *Bombyx mori latent virus* (BmLV) en Chronic bee paralysis virus (CBPV) en voor de plaatsing van deze virussen op Bijlage 4 van de Regeling ggo.¹ Bijlage 4 van de Regeling GGO betreft de lijst met pathogene virussen, bacteriën, schimmels en parasieten van pathogeniteitsklassen 2 tot en met 4. Tevens is gevraagd of BmLV en CBPV als strikt dierpathogeen moeten worden beschouwd. De adviesvraag komt voort uit een vergunningaanvraag van de Wageningen Universiteit (IG 21-139_2.13).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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 (CGM/141216-02). 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.² 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 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-specifieke virussen.² 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 2.³

3. *Bombyx mori latent virus*

Bombyx mori latent virus (BmLV) is in 2005 voor het eerst geïdentificeerd in de cellijn BmN-4, een cellijn afgeleid van de zijderups *Bombyx mori*.⁴ Het virus kreeg destijds de naam *Bombyx mori macula-like virus* (BmMLV) gezien zijn gelijkenis met *Maculovirus*, een plantvirus-genus binnen de familie *Tymoviridae*. Tegenwoordig draagt dit virus de naam BmLV en is BmLV toegewezen aan het genus

Tymovirus in de familie *Tymoviridae*.⁵ BmLV is een positief-strengs RNA virus met een genoom van 6.5 kb, coderend voor eiwitten die homoloog zijn aan het RNA-afhankelijk RNA polymerase (RdRp) en een 'coat protein' (CP) van virussen behorend tot de familie *Tymoviridae*.⁴ Daarnaast is er subgenomisch RNA van 1.25 kb aangetroffen met daarop een openleesraam voor een polypeptide van 15.2 kDA (p15) met onbekende functie.^{4,6}

BmLV is naast BmN-4 in nog zes andere cellijnen van *B. mori* gedetecteerd.⁷ Een BmLV-vrije cellijn van *B. mori* kon geïnfecteerd worden met BmLV, waarbij geen cytopathische effecten zijn waargenomen.⁷ BmLV infecteert tevens *B. mori* larven en blijft chronisch in de weefsels aanwezig zonder dat de larven ziekteverschijnselen vertonen.⁴ Het virus wordt niet doorgegeven aan de volgende generatie zijderupsen.⁴ BmLV kan ook een interactie aangaan met het *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), een DNA virus dat eveneens *B. mori* infecteert.⁸ Bij co-infectie van *B. mori* larven met BmLV en BmNPV was een verhoogde replicatie van BmLV waargenomen en zijn er BmLV virusdeeltjes in de 'occlusion bodies' van BmNPV aangetroffen.

Hoe het BmLV virus zich vermenigvuldigt en een persistente infectie teweegbrengt is grotendeels onbekend, al lijkt het virale p15 eiwit een rol te spelen.⁶ BmLV kan ook cellen van de cellijn Sf-9, afkomstig van de vlindersoort *Spodoptera frugiperda* (Legerrups), binnendringen, maar kan niet in deze cellen repliceren.^{4,9} Cellen van humane (HeLA cellijn) en dierlijke oorsprong (o.a. Vero, CRFK, PPK3F, CHO cellijnen) waren alle niet ontvankelijk voor BmLV.⁹

4. Chronic bee paralysis virus

Chronic bee paralysis virus (CBPV) is in 1963 voor het eerst geïsoleerd uit honingbijen, *Apis mellifera* L.¹⁰ CBPV is een positief-strengs RNA virus, met een gesegmenteerd genoom bestaande uit twee RNA-strengen van 3674 en 2305 bp lang, met respectievelijk drie en vier openleesramen.¹¹ Eén van de openleesramen op de eerste RNA streng codeert voor het RdRp dat gedeeltelijk overeenkomstig is aan het RdRp van virussen van de *Nodaviridae* en *Tombusviridae* families.¹¹ Twee openleesramen op de tweede RNA-streng coderen waarschijnlijk voor structurele eiwitten die het 'capside' van het virusdeeltje vormen.¹² De producten en functies van de overige openleesramen zijn niet bekend.¹¹ CBPV is tot op heden geen genus of familie toegekend, en is niet opgenomen in het taxonomieregister van de 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV).

Infectie met CBPV veroorzaakt chronische verlamming bij honingbijen, met de dood tot gevolg. De honingbijen worden trillerig, kruipen over de grond en kunnen ook hun haren verliezen waardoor ze er zwart-glimmend uitzien en verstoten worden door de gezonde bijen in de kolonie.¹³ Geïnfecteerde en verlamde honingbijen scheiden infectieuze CBPV virusdeeltjes uit via hun feces, waarmee gezonde honingbijen in contact komen en waardoor de ziekte zich in de kolonie verspreidt.¹⁴ Het virus verspreid zich ook door direct contact tussen de bijen, en mogelijk ook via verticale transmissie via de bijenkoningin optreden.^{13,15} De door CBPV-veroorzaakte chronische verlamming bij honingbijen komt wereldwijd voor, en maakt een opmars in Azië, Europa en Noord-Amerika.¹⁶

5. Eerder COGEM advies en internationale instanties

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over BmLV of CBPV, of over virussen behorend tot de *Tymoviridae* familie waartoe BmLV behoort.

Inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de pathogeniteitsclassificatie die door de COGEM wordt uitgevoerd. Beiden virussen, BmLV en CBPV, staan echter niet op de classificatielijsten van de Zwitserse¹⁷, Belgische¹⁸ of Duitse¹⁹ instanties.

6. Overweging en advies

BmLV veroorzaakt een persistente infectie in *B. mori* larven, maar deze infectie leidt niet tot ziekteverschijnselen of overlijden.^{4,7} In cellijnen afkomstig van een andere vlindersoort, *S. frugiperda*, kunnen de virusdeeltjes langere tijd aanwezig blijven maar zich niet propageren.^{4,7,6} Cellen van zoogdierlijke of menselijke oorsprong zijn niet ontvankelijk voor BmLV.⁷ Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend die BmLV in verband brengen met pathogeniteit voor planten of vertebraten, waaronder de mens.

CBPV veroorzaakt wereldwijd lethale infecties in *A. mellifera*.¹⁶ Infectie met het virus leidt tot chronische verlamming en is lethaal voor de honingbij, waardoor gehele kolonies instorten.¹³ Sinds de ontdekking van het virus in 1963 is CBPV in de wetenschappelijke literatuur niet geassocieerd met ziekte bij andere diersoorten, waaronder de mens, of bij planten.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat BmLV en CBPV als insect-specifieke virussen gekenmerkt kunnen worden. De COGEM adviseert derhalve om BmLV en CBPV als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en te plaatsen op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.

7. Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01> (bezoekt op 12 augustus 2021)
2. Vlak J (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. COGEM onderzoeksrapport CGM 2019-01
3. COGEM (2019) Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
4. Katsuma S *et al.* (2005). Novel macula-like virus identified in *Bombyx mori* cultured cells. *J. Virol.* 79:5577–5584
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) *Bombyx mori latent virus*. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt op 12 augustus 2021)
6. Katsuma S *et al.* (2018). Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. *DNA res.* 25:277–286
7. Iwanaga M *et al.* (2012). Infection study of *Bombyx mori macula-like virus* (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. *J. Virol. Methods* 179:316–324
8. Tsukui K *et al.* (2019). Infectious virions of *Bombyx Mori Latent Virus* are Incorporated into *Bombyx Mori Nucleopolyhedrovirus* occlusion bodies. *Viruses* 11:316
9. Innami K *et al.* (2016). Infection studies of nontarget mammalian cell lines with *Bombyx mori macula-like virus*. *J. Virol. Methods.* 229:24–26

10. Bailey L *et al.* (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21:390-395
11. Olivier V *et al.* (2008). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus res.* 132:59–68
12. Chevin A *et al.* (2015). Characterisation of structural proteins from Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) using mass spectrometry. *Viruses* 7:3329–3344
13. Ribière M *et al.* (2010). Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J. Invertebr. Pathol.* 103:S120–S131
14. Ribière M *et al.* (2007). Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7711–7716
15. Bailey, L. *et al.* (1983). Honeybee paralysis - its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *J. Apicul. Res.* 22: 191–195
16. Budge GE *et al.* (2020). Chronic bee paralysis as a serious emerging threat to honey bees. *Nat. Comm.* 11:2164
17. Bundesamt für Umwelt (BAFU)
<https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht op 12 augustus 2021)
18. Belgian Biosafety Server <https://www.biosafety.be/content/tools-belgian-classification-micro-organisms-based-their-biological-risks> (bezocht op 12 augustus 2021)
19. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA)
<https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html> (bezocht op 12 augustus 2021)