

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 27 december 2022
KENMERK CGM/221227-02
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van het *Bovine leukemia virus* (BLV)

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van Intervet International B.V. om de pathogeniteitsklasse van *Bovine leukemia virus* (BLV) te bepalen (IG 17-018_2.8-011), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van het *Bovine leukemia virus* (BLV). Tevens is gevraagd of dit virus als strikt dierpathogeen beschouwd kan worden.

Het BLV is een retrovirus dat runderleukose ofwel enzoötische boviene leukose (EBL), kan veroorzaken in runderen. De meeste infecties verlopen zonder symptomen, maar een klein deel (<10%) van de geïnfecteerde dieren kan uiteindelijk tumoren ontwikkelen, waar zij aan kunnen overlijden. De ziekte is meldingsplichtig; verspreiding van EBL kan grote economische gevolgen hebben. In Nederland komt BLV niet meer voor.

Antilichamen tegen BLV zijn in mensen gedetecteerd, het is echter onduidelijk of BLV daadwerkelijk mensen kan infecteren. In enkele studies zijn BLV sequenties in weefsel van borsttumoren en in bloed van mensen aangetroffen, maar er zijn ook studies die daar geen bewijs voor hebben kunnen vinden. Een directe causale associatie tussen BLV en borstkanker of andere ziekten bij de mens is niet aangetoond.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het *Bovine leukemia virus* (BLV) 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.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Pathogeniteitsclassificatie van het *Bovine leukemia virus* (BLV)

COGEM advies CGM/221227-02

1. Inleiding

In verband met een vergunningaanvraag van Intervet International BV (IG 17-018), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het *Bovine leukemia virus* (BLV) voor plaatsing op lijst 4.1 van 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. Lijst 4.1 betreft de indeling in klassen van pathogene virussen. Tevens is de COGEM gevraagd of BLV beschouwd dient te worden als strikt dierpathogeen.

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.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.

3. Bovine leukemia virus (BLV)

Het BLV is een exogeen retrovirus dat behoort tot het genus *Deltaretrovirus* uit de subfamilie *Orthoretrovirinae* en familie *Retroviridae*.⁴ Tot dit genus behoren nog drie andere virussoorten: *Primate T-lymphotropic virus 1* en *2* (voorheen Human T-lymphotropic virus (HTLV) 1 en 2) en *Primate T-lymphotropic virus 3*. Het virus is voor het eerst geïsoleerd in 1969.⁵

Retrovirussen bezitten een enkelstrengs RNA genoom dat omgeven is door capsid-eiwitten en een lipidenmembraan, de zogenaamde 'envelop'.⁶ Kenmerkend voor retrovirussen is dat bij infectie het RNA genoom door een virus-specifiek polymerase, het 'reverse transcriptase' wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA (het zogenaamde provirus), dat in het genoom van de gastheercel integreert.⁶ Het geïntegreerde provirale genoom kan in de gastheercel aanwezig blijven zolang de gastheer blijft bestaan.⁷ Vanuit het provirale genoom in de gastheercel kunnen nieuwe infectieuze virusdeeltjes gevormd worden, die op hun beurt nieuwe cellen kunnen infecteren en zich kunnen verspreiden tussen gastheren.^{7,8}

3.1 Pathogeniteit en verspreiding van BLV

Het BLV kan runderleukose ofwel enzoötische boviene leukose (EBL) veroorzaken in runderen, een ziekte waarbij een subset van de B-lymfocyten persistent wordt geïnfecteerd door het virus.^{9,10} De meeste infecties verlopen asymptomatisch (subklinisch). Ongeveer 30%-70% van de geïnfecteerde dieren ontwikkelt lymfocytose, een toename in het aantal witte bloedcellen.^{11,13} Een klein deel van de geïnfecteerde dieren (0,1 tot 10% en meestal dieren ouder dan 3 jaar) ontwikkelt tumoren in lymfeklieren en diverse organen, waar zij aan kunnen overlijden.^{10,11,12,13} De meest voorkomende symptomen bij het ontstaan van de tumoren zijn opgezwollen lymfeklieren, opportunistische infecties, gewichtsafname en afname in melkproductie.¹⁰ De gevoeligheid van runderen voor het ontwikkelen van lymfocytose, en mogelijk ook tumoren, is vaak genetisch bepaald.¹¹

BLV verspreidt zich horizontaal via het bloed, speeksel, melk, sperma en neusvocht van geïnfecteerde dieren, en kan zich ook verticaal verspreiden.¹¹ Het virus kan ook overgedragen worden via bijtende vliegen, die zich met het geïnfecteerde bloed voeden.¹¹ Omdat de meeste infecties asymptomatisch verlopen, is het lastig om verspreiding in te perken. BLV heeft naast rundvee (*Bos domesticus*), ook waterbuffels (*Bubalus bubalis*) en zebou (*Bos indicus*) als natuurlijke gastheer.¹³ Een reeks andere diersoorten (herten, konijnen, ratten, cavia's, katten, honden, schapen, resusapen, chimpansees, antilopen, varkens, geiten en buffels¹¹) kan experimenteel geïnfecteerd worden met BLV, en vertonen onder deze experimentele omstandigheden een antilichaamrespons met variërende klinische symptomen. In konijnen werd onder meer conjunctivitis, rhinitis, gewichtsafname en plotselinge sterfte waargenomen, in ratten en zwijnen werden geen pathogene effecten waargenomen, en in kippen ontwikkelde een klein deel van de geïnfecteerde dieren leukemie.¹⁴ Met name schapen zijn gevoelig voor experimentele inoculatie, en ontwikkelen tumoren op een jongere leeftijd dan geïnfecteerde runderen.¹¹

In mensen kunnen antilichamen tegen BLV worden aangetroffen.¹⁵ Er is in de wetenschappelijk literatuur een discussie gaande over een mogelijke link tussen BLV en borstkanker bij mensen.^{16,17} Er zijn studies die de aanwezigheid van het virus aantonen in borstkankerpatiënten.^{18,19,20} BLV DNA is ook aangetroffen in bloed van vrouwen zonder borstkanker.²¹ Daartegenover zijn er ook enkele studies geweest die deze bevindingen niet hebben kunnen reproduceren.^{22,23,24} Een *in vitro* studie toont aan dat sommige humane cellijnen vatbaar zijn voor BLV-infectie, waarbij detectie van virus naar verloop van tijd afneemt.²⁵ In de humane cellijnen MCF-7 (borstklierzellen) en iSLK (niercellen) werd een stabiele infectie waargenomen. Er zijn geen morfologische veranderingen waargenomen in deze BLV-geïnfecteerde cellijnen.²⁵

3.2 Meldingsplicht

In Nederland is EBL een meldingsplichtige ziekte.²⁶ Nederland is samen met een aantal andere EU-lidstaten officieel vrij van EBL. Met name in Oost-Europa komt EBL nog wel voor.²⁷ In de Verenigde Staten en Canada komt EBL vaker voor. Tot op heden is er geen commercieel vaccin beschikbaar om EBL te voorkomen.¹³ De ziekte kan grote economische gevolgen hebben, onder andere door afname in de melkproductie, verminderde reproductie en sterfte, maar ook indirect door het verbod op import van

dieren uit BLV-geïnfecteerde gebieden.^{13,28} EBL is daarom ook door de ‘World Organisation for Animal Health’ (WOAH) opgenomen als ‘Listed Disease’, een meldingsplichtige ziekte van internationaal belang.²⁹ Landen of regio’s kunnen gekwalificeerd worden als EBL-vrije zone wanneer zij gedurende 3 jaar geen EBL in hun veestapel aantreffen.²⁸

4. Eerder COGEM advies en pathogeniteitsclassificatie door andere beoordelende instanties

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over het *Bovine leukemia virus*. Wel heeft zij de drie andere virussoorten in het genus *Deltaretrovirus*; *Primate T-lymphotropic virus 1, 2, en 3*, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.³⁰

De Zwitserse ‘Bundesamt für Umwelt’ (BAFU) heeft BLV ingedeeld in risicogroep 2, en heeft hierbij niet gespecificeerd of het een humaan- of dierpathogeen betreft.³¹ De Belgische biologische veiligheidsinstantie ‘Belgian Biosafety Server’ heeft het BLV ingedeeld als dierpathogeen in risicogroep 3.³² In de ‘Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) van de ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA), die zich voor de risicobeoordeling richt op veiligheid voor medewerkers, is BLV ingedeeld in risicogroep 1, met de vermelding dat uit diergezondheidsoogpunt ook veiligheidsmaatregelen toegepast kunnen worden die vergelijkbaar zijn met de maatregelen voor pathogenen van risicogroep 2.³³ De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

5. Overweging en advies

Het *Bovine leukemia virus* (BLV) is een virus dat runderen infecteert en in deze dieren de ziekte EBL kan veroorzaken. Ook zebou en waterbuffels zijn natuurlijke gastheren. Hoewel de meeste infecties asymptomatisch verlopen, kan een deel van de geïnfecteerde runderen tumoren ontwikkelen waaraan zij komen te overlijden. Een groot aantal verschillende zoogdieren kan experimenteel geïnfecteerd worden met BLV, waarbij sommige van deze diersoorten klinische symptomen ontwikkelen.

Over het mogelijke zoönotische potentieel van BLV geeft de wetenschappelijke literatuur nog geen uitsluitsel. Antilichamen tegen BLV zijn in mensen gedetecteerd. Hoewel dit niet als direct bewijs fungeert voor infectie bij mensen (mogelijk kunnen ook antilichamen geproduceerd zijn als reactie op BLV antigenen die via voedsel binnenkomen¹⁵), wordt bij *in vitro* studies gerapporteerd dat humane cellijnen, waaronder borstkankercellijnen enige tijd geïnfecteerd kunnen worden met BLV. In verschillende cellijnen verdwijnt het virale DNA na enige tijd, terwijl bij een succesvolle infectie waarbij ook integratie van het genoom optreedt, juist verwacht wordt dat sequenties aanwezig blijven. In MCF-7 en iSLK cellijnen werd gedurende het betreffende onderzoek (3 maanden) wel een stabiele infectie waargenomen, waarbij geen morfologische verandering van de cellen is opgetreden. Hierbij is niet onderzocht of er nieuwe virusdeeltjes geproduceerd werden en dus sprake is van een productieve infectie. In enkele studies zijn BLV-sequenties in weefsel afkomstig van borsttumoren en bloed aangetroffen, maar er zijn ook studies die daar geen bewijs voor hebben kunnen vinden. Een directe causale associatie tussen BLV en borstkanker of andere ziekten bij de mens is echter niet aangetoond.

De ziekte veroorzaakt door BLV (EBL) is wereldwijd meldingsplichtig, waaronder in Nederland, en kan grote impact hebben op de internationale handel. Er is geen vaccin beschikbaar.³⁴ BLV komt niet in Nederland voor, Nederland heeft sinds 1 juli 1999 de officiële leukose-vrij status.³⁵

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het *Bovine leukemia virus* (BLV) ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 2, en geplaatst kan worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo. Op basis van de informatie uit de wetenschappelijke literatuur is BLV dierpathogeen, maar is niet vast te stellen of BLV een strikt dierpathogeen is.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-07-01> (bezocht: 20 december 2022)
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. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) taxonomy <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht op 20 december 2022)
5. Miller JM *et al.* (1969) Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 43: 1297–1305
6. Coffin J *et al.* (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. J. Gen. Virol. 102: 001712
7. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. Retrovirology 15: 59
8. Mager DL & Stoye JP (2014). Mammalian endogenous retroviruses. Microbiol. Spectr. 3: MDNA3-0009-2014
9. Kettmann R *et al.* (1976). *Bovine leukemia virus*: An exogenous RNA oncogenic virus. Proc. Nat. Acad. Sci. 73 : 1014-1018
10. European Food Safety Authority (EFSA, 2015). Enzootic bovine leukosis. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4188> (bezocht op 15 december 2022)
11. World Organisation for Animal Health (WOAH). Terrestrial manual 2018. Chapter 3.4.9. Enzootic Bovine Leukosis. p.1113-1124. <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (bezocht op 15 december 2022)
12. Wageningen University & Research. Runderleukose (enzoötische boviene leukose). <https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/onderzoeksinstituten/biovetinary-research/dierziekten/virusziekten/runderleukose.htm> (bzocht: 20 december 2022)
13. Marawan MA *et al.* (2021). Bovine leukaemia virus: current epidemiological circumstance and future prospective. Viruses 13: 2167
14. Porta NG *et al.* (2019). Experimental infection of sheep with *Bovine leukemia virus* (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies. Revista Argentina de Microbiología. 4: 316-323

15. Buehring GC *et al.* (2003). Humans have antibodies reactive with *Bovine leukemia virus*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 19: 1105-1113
16. Martinez Cuesta L *et al.* (2018). Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 23: 101–107
17. Lawson JS & Glenn WK (2021). Catching viral breast cancer. *Infect. Agent Cancer* 16: 37
18. Buehring GC *et al.* (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PloS one*, 10: e0134304
19. Olaya-Galán NN *et al.* (2021). Risk factor for breast cancer development under exposure to *Bovine leukemia virus* in Colombian women: A case-control study. *PloS one* 16: e0257492
20. Delarmelina E *et al.* (2020). High positivity values for *Bovine leukemia virus* in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. *PloS one* 15: e0239745
21. Buehring GC *et al.* (2019). *Bovine leukemia virus* discovered in human blood. *BMC Infect. Dis.* 19: 297
22. Gillet NA & Willems L (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of *Bovine leukemia virus* DNA. *Retrovirology* 13: 75
23. Zhang R *et al.* (2016). Lack of association between *Bovine leukemia virus* and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Res.* 18: 101
24. Yamanaka MP *et al.* (2022). No evidence of *Bovine leukemia virus* proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan. *Retrovirology* 19: 7
25. Olaya-Galán NN *et al.* (2022). In vitro Susceptibility of Human Cell Lines Infection by Bovine Leukemia Virus. *Front. Microbiol.* 13: 793348
26. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). Lijst met aangifteplichtige dierziekten. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/dierziekten/lijest-aangifteplichtige-dierziekten> (bezocht op 15-12-2022)
27. Gezondheidsdienst voor Dieren (GD). Enzootische Bovine Leucose. [https://www.gddiergezondheid.nl/nl/dapcontact/Dierziekten/EBL#:~:text=Enzo%C3%B6tische%20Bovine%20Leucose%20\(EBL\)%20is,volgens%20de%20dan%20geldende%20draaiboeken](https://www.gddiergezondheid.nl/nl/dapcontact/Dierziekten/EBL#:~:text=Enzo%C3%B6tische%20Bovine%20Leucose%20(EBL)%20is,volgens%20de%20dan%20geldende%20draaiboeken). (bezocht op 15-12-2022)
28. World Organisation for Animal Health (2021). Terrestrial Animal Health Code Vol. II. Recommendations applicable to OIE listed diseases. https://doc.woah.org/dyn/portal/digidoc.xhtml?statelessToken=4iFBL9RYZtxiXDPYY6D2oKfU9dtp4S0_3t13bffPBOQ=&actionMethod=dyn%2Fportal%2Fdigidoc.xhtml%3AdownloadAttachment.openStateless (bezocht: 21 december 2022)
29. World Organisation for Animal Health. Listed Diseases https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/?_tax_animal=terrestrials%2Cbovine&_tax_diseases=listed-diseases (bezocht: 21 december 2022)
30. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA-virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
31. Federal Office of the Environment (FOEN). <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezocht op 16 december 2022)

32. Belgian Biosafety Server. <https://www.biosafety.be/content/tools-belgian-classification-micro-organisms-based-their-biological-risks> (16-12-2022)
33. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html> (bezocht op 16 december 2022)
34. World Organisation for Animal Health. Enzootic bovine leukosis. <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (bezocht op 16 december 2022)
35. DAP contact. Voor dierenartsen. Dierziekten: EBL. <https://www.gddiergezondheid.nl/nl/dapcontact/Dierziekten/EBL#regel> (Bezocht op 21 december 2022)