

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

DATUM 12 april 2023
KENMERK CGM/230412-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie narnavirus CxNV1 en AejaNV1

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van de Wageningen Universiteit om de pathogeniteitsklasse van de narnavirussen CxNV1 en AejaNV1 te bepalen (IG 23-046_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de narnavirussen CxNV1 en AejaNV1. Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen als insect-specifieke en strikt dierpathogene virus beschouwd kunnen worden.

Narnavirussen komen voor in uiteenlopende organismen zoals schimmels, planten, geleedpotigen, nematoden en protisten. Het zijn zogenaamde 'naakte' RNA virussen die geen virusdeeltjes vormen. Overdracht van deze virussen vindt alleen plaats via overerving en paring. Verspreiding naar andere organismen dan hun gastheer is daardoor nagenoeg uitgesloten. Er zijn geen meldingen dat deze virussen ziekten of symptomen veroorzaken in hun gastheren

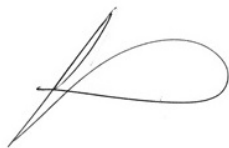
Culex narnavirus 1 (CxNV1) is aangetroffen in cellijnen afkomstig van de mug *Culex pipiens* (de gewone steekmug). AejaNV1 is aangetoond in muggen van *Aedes japonicus* (Aziatische bosmug). Onbekend is of deze virussen nadelige gevolgen kunnen hebben voor de muggen of hun populatie.

De COGEM is van oordeel dat Narnavirus CxNV1 en Narnavirus AejaNV1 als strikt dierpathogene, insect-specifieke virussen ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2 en opgenomen kunnen 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 belangenverstremgeling is het COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Pathogeniteitsclassificatie van de narnavirussen CxNV1 en AejaNV1

COGEM advies CGM/230412-01

1. Inleiding

In verband met een verzoek van de Wageningen Universiteit (IG 23-046), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het Narnavirus CxNV1 en het Narnavirus AejaNV1 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 de narnavirussen CxNV1 en AejaNV1 beschouwd dient te worden als strikt dierpathogeen, of als dier- en humaan pathogeen.

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 oenschouw 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. Narnaviridae

De familie *Narnaviridae* bestaat uit het genus *Mitovirus* en het genus *Narnavirus*, met de species *Saccharomyces 20S RNA narnavirus*.⁴ Hoewel er een groot aantal narnavirussen geïdentificeerd is, heeft de ICTV nog geen van deze virussen als species ingedeeld of erkend.

Narnavirussen ('naked RNA viruses') worden aangetroffen in schimmels, planten, geleedpotigen, nematoden en protisten.⁵ Narnavirussen vormen geen (extracellulaire) virusdeeltjes en komen enkel als RNA in het cytoplasma van de cel van hun gastheer voor.

Het genoom van narnavirussen is een positief-strengs RNA van 2,3 tot 3,6 kb in lengte. Oorspronkelijk werd gedacht dat het genoom van narnavirussen slechts één open leesraam (ORF) bevat dat nagenoeg het gehele genomische RNA in beslag neemt en codeert voor het RNA-polymerase. Later zijn zogenaamde 'ambigramatic' narnavirussen geïdentificeerd waarbij een met het RNA-polymerase overlappend ORF aanwezig is in de andere (negatieve) oriëntatie.⁶ Het product van dit rORF heeft geen sequentie-overeenkomsten met bekende eiwitten. Het mechanisme waarmee dit rORF afgelezen wordt, de functie van het product en waarom de verschillende narnavirussen dit rORF wel of niet hebben, zijn

nog onbekend. Gesuggereerd is dat het ORF een rol speelt bij de replicatie van het virale genoom of bij het onderdrukken van afweerreacties van de gastheer.^{7,8} Het narnavirale genoom codeert niet voor structurele eiwitten.

De RNA-polymerases van narnavirussen zijn verwant aan die van RNA bacteriofagen (*Leviviridae*, genus *Levivirus*, Enterobacteria phage MS2 en genus *Allolevivirus*, Enterobacteria phage Qbeta).^{9,10} Narnavirussen zijn verder verwant aan de mitovirussen die in planten voorkomen.⁴ Deze eveneens 'naakte' RNA-virussen repliceren in de mitochondriën. Verondersteld wordt dat narnavirussen evolutionair afstammen van de mitovirussen. Mitovirussen zouden dan afstammen van levivirus-achtige bacteriofagen die de voorlopers van mitochondriën infecteerden, waarbij deze virussen gedurende de evolutie hun structurele genen verloren zouden hebben.⁶

Narnavirussen verspreiden via paring en celfusie van de gastheer, en overerving. Vanwege hun wijze van transmissie is verspreiding naar andere soorten nagenoeg uitgesloten. De virussen zijn persistent aanwezig in hun gastheer, maar lijken geen duidelijke symptomen of ziekte te veroorzaken.

4. Narnavirus CxNV1 en Narnavirus AejaNV1

Culex narnavirus 1 (CxNV1) is gedetecteerd in cellijnen van de mug *Culex pipiens* (Gewone steekmug) via sequencing van het RNA-transcriptoom en bioinformatische analyses.¹¹ AejaNV1 is via RNA-sequencing aangetoond in *Aedes japonicus* (Aziatische bosmug) muggen.¹² De genomen zijn respectievelijk 3.105 en 3.069 nucleotiden in lengte. Beide virussen vertonen homologie met andere narnavirussen van insecten. AejaNV1 is verwant aan Zhejiang mosquito virus 3, dat in Australië in muggen is aangetoond.¹² Eerder aan de andere insecten-narnavirussen behoren Narnavirus CxNV1 en Narnavirus AejaNV1 tot de 'ambigramatic' narnavirussen.

Mede omdat narnavirussen oorspronkelijk alleen in schimmels en oömyceten werden aangetroffen, is geopperd dat de in insecten aangetoonde narnavirussen infecties zijn van parasitaire of endosymbiotische schimmels en gisten.¹³ Echter in de cellijnen waarin CxNV1 werd aangetroffen konden geen contaminaties met bacteriën of schimmels worden aangetoond, en waren er aanwijzingen voor virale replicatie in de cellijnen.¹¹ Daarnaast zijn er hoge narnavirale RNA-concentraties in muggen aangetroffen. Dit wijst erop dat het hier gaat om virussen die de insecten infecteren.⁶

Er zijn geen gegevens bekend of de virussen symptomen, ziekten of nadelige effecten in muggenpopulaties veroorzaken.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over narnavirussen. In 2019 heeft de COGEM onderzoek laten uitvoeren naar de karakteristieken en pathogeniteit van RNA- en DNA-virussen met insecten als gastheer, om te onderzoeken of het mogelijk is om insect-specifieke virussen generiek te classificeren, analoog aan de klasse 2 indeling van plantenvirussen.¹⁴ 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 2.¹⁵

6. Overweging en advies

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel, dat Narnavirus CxNV1 en Narnavirus AejapNV1 als insect-specifieke en daarmee strikt dierpathogene virussen ingedeeld kunnen worden in pathogeniteitsklasse 2, en geplaatst kunnen worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-04-01> (bezoekt op 5 april 2023)
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. ICTV 9th Report (2009). Family Narnaviridae. https://ictv.global/report_9th/RNApos/Narnaviridae (bezoekt op 5 april 2023)
5. Hiba Y *et al.* (2023). The first identification of a narnavirus in Bigyra, a marine protist. *Microbes Environ.* 38: ME22077, doi:10.1264/jsme2.ME22077
6. Dinan AM *et al.* (2020). A case for a negative-strand coding sequence in a group of positive-sense RNA viruses. *Virus Evol.* 6:veaa007, doi: 10.1093/ve/veaa007
7. DeRisi JL *et al.* (2019). An exploration of ambigrammatic sequences in narnaviruses. *Sci. Rep.* 9: 17982, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54181-3>
8. Retallack *et al.* (2021). Persistence of ambigrammatic narnaviruses requires translation of the reverse open reading frame. *J. Virol.* 95:e00109-21, <https://doi.org/10.1128/JVI.00109-21>.
9. Wolf YI *et al.* (2018). Origins and evolution of the global RNA virome. *mBio* 9:e02329-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02329-18>.
10. Shi M *et al.* (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540: 539–543, <https://doi.org/10.1038/nature20167>
11. Göertz GP *et al.* (2019). Mosquito small rna responses to west nile and insect-specific virus infections in *Aedes* and *Culex* mosquito cells. *Viruses* 11: 271-289, doi: 10.3390/v11030271
12. Abbo SR *et al.* (2020) The invasive Asian bush mosquito *Aedes japonicus* found in the Netherlands can experimentally transmit *Zika virus* and *Usutu virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14: e0008217. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008217>
13. Cook S *et al.* (2013) Novel virus discovery and genome reconstruction from field RNA samples reveals highly divergent viruses in dipteran hosts. *PLoS ONE* 8: e80720, doi:10.1371/journal.pone.0080720
14. Vlak J (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. COGEM onderzoeksrapport CGM 2019-01
15. COGEM (2019). Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01