

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 19 september 2013  
**KENMERK** CGM/130919-01  
**ONDERWERP** Advies Shuni virus reverse-genetics

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag met de titel 'Shuni virus reverse-genetics' van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Shuni virus* (SHUV). De aanvrager wil ten behoeve van fundamenteel onderzoek naar SHUV een zogenaamd 'reverse-genetics systeem' ontwikkelen voor de productie van SHUV deeltjes. De COGEM is ook verzocht te adviseren over de inschaling van de werkzaamheden met SHUV deeltjes.

SHUV infecteert verschillende diersoorten. Runderen vertonen na infectie met SHUV geen ziekteverschijnselen, terwijl infectie van paarden neurologische symptomen geeft. Infectie met SHUV vindt vermoedelijk plaats via knutten of steekmuggen, hoewel aerogene transmissie niet is uitgesloten. Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat SHUV ingedeeld moet worden in pathogeniteitsklasse 2.

Experimenten met delen van het genoom van SHUV in *E. coli* en SHUV eiwitten in eukaryote cellen adviseert de COGEM op ML-I inperkingsniveau in te schalen. Werkzaamheden met infectieuze SHUV deeltjes adviseert de COGEM op ML-II inperkingsniveau in te schalen met de aanvulling dat open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II moeten plaatsvinden.

Bij uitvoering van de werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van een aanvullend voorschrift is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
               Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

*Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Shuni virus reverse-genetics

## COGEM advies CGM/130919-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse het *Shuni virus* (SHUV) ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met SHUV genoomsegmenten en infectieuze SHUV deeltjes. Het voornaamste doel van de voorgenomen werkzaamheden is om een ‘reverse genetics’ systeem te ontwikkelen voor de productie van SHUV deeltjes. Deze deeltjes zullen worden gebruikt voor fundamenteel onderzoek.

#### 1.1 *Shuni virus*

SHUV is aangetroffen in runderen, paarden, schapen, geiten, en verschillende wilde dieren.<sup>1,2,3,4</sup> Daarnaast is het virus ook aangetroffen in knutten en steekmuggen (*Culex theileri*). Er is een hoge prevalentie in runderen, maar die vertonen geen ziekteverschijnselen.<sup>1</sup> SHUV veroorzaakt een ziekte in paarden. Symptomen hiervan zijn koorts en neurologische symptomen zoals ataxie, spiertrillingen, stuip trekkingen en gedeeltelijke verlamming.<sup>5</sup> Er is één rapport verschenen waarbij middels serologische tests infectie met SHUV is aangetoond in mensen, dit betrof één kind met koorts in 1966.<sup>6</sup> Verdere klinische gegevens zijn niet bekend, behalve dat het kind niet werd opgenomen in een ziekenhuis. Tot nog toe zijn SHUV infecties alleen gerapporteerd in Afrika (Nigeria, Zimbabwe en Zuid-Afrika). Transmissie van SHUV lijkt plaats te vinden via knutten en steekmuggen. Transmissie via aerosolen kan niet uitgesloten worden. Er is geen behandeling of vaccin beschikbaar.

#### 1.2 *Genomische organisatie van SHUV*

Het *Shuni virus* behoort tot de familie van de *Bunyaviridae*, het genus *Orthobunyavirus*.<sup>7</sup> SHUV is ingedeeld in de Simbu serogroep waartoe ook het Schmallerbergvirus, het *Akabane virus* en het *Shamonda virus* behoren. SHUV is een enkelstrengs (-) RNA virus met een genoom dat bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment. Het S-RNA codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de genoomsegmenten het zogenaamde ‘nucleocapside’. Daarnaast codeert het S-RNA voor het niet-structurele eiwit NSs. De exacte functie van NSs in SHUV is niet duidelijk, in *Rift Valley fever virus* (RVFV) is NSs betrokken bij blokkering van interferon genexpressie. Het M-RNA codeert voor de glycoproteïnen Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden. Deze interactie faciliteert de opname van het virus in de cel. Het L-RNA codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese. Aan de 5’ en 3’ uiteinden van de genoomsegmenten van SHUV bevinden zich sequenties die niet coderen voor een eiwit, de zogenaamde ‘untranslated regions’ of UTRs. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTRs verschillend in lengte en nucleotidenvolgorde. De UTRs zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.

## 2. De voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager geeft aan genen en delen van genen van SHUV tot expressie te willen brengen in eukaryote cellen. Daarnaast wil de aanvrager experimenten uitvoeren waarbij replicatiecompetente, infectieuze gg-SHUV virusdeeltjes vervaardigd worden. Deze virusdeeltjes worden verkregen door productiecellen te transfecteren met constructen die de volledige genoomsegmenten S, M en L van SHUV bevatten. Expressie van de genoomsegmenten staat onder de controle van een T7 promotor. Door de cellen te infecteren met *Fowlpox virus* die een T7 polymerase tot expressie brengt kunnen virusdeeltjes geproduceerd worden. De geproduceerde virusdeeltjes worden gebruikt om animale cellen en insectencellen te infecteren.

## 3. Classificatie

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Daartoe is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.<sup>8</sup> 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
  - het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
  - het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
  - 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;
  - van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.
- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.
- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

SHUV is door het Amerikaanse Centers for Disease Control and Prevention<sup>9</sup>, het Zwitserse 'Federal Office for the Environment'<sup>10</sup>, het Duitse 'The Federal Institute for Occupational Safety and Health'<sup>11</sup> en het Belgische 'Scientific Institute of Public Health'<sup>12</sup> ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

#### **4. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over het SHUV. Zij heeft in de periode 2008 - 2013 wel over de classificatie en inschaling van vier andere leden van de familie *Bunyaviridae* geadviseerd: het *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV)<sup>13</sup>, RVFV<sup>14</sup>, Schmallenbergvirus (SBV)<sup>15</sup> en *Huaiyangshan virus* (HYSV)<sup>16</sup>. De COGEM heeft CCHFV en HYSV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4 en het RVFV en SBV in pathogeniteitsklasse 3.

#### **5. Overweging en advies**

##### *5.1 Classificatie van SHUV*

Sinds de ontdekking van SHUV in jaren '60 is het virus alleen aangetroffen in Afrika. SHUV is geïsoleerd uit knutten en muggen. Daarnaast is het virus ook geïsoleerd uit paarden, runderen, schapen, geiten, en wilde dieren. Het virus veroorzaakt alleen een ziekte in paarden.

In de wetenschappelijke literatuur is één keer de isolatie van SHUV uit de mens gerapporteerd. Deze studie is gebaseerd op serologische tests. Het betrof een kind met koorts en het is niet duidelijk of de koorts door het virus veroorzaakt werd. Mens-op-mens besmetting van SHUV is niet beschreven. Het virus is niet aangetoond in Nederland. Het is niet bekend welke vectoren dit virus kunnen verspreiden. Er is geen behandeling of effectieve profylaxe beschikbaar.

Op basis van bovenstaande overweging adviseert de COGEM SHUV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

##### *5.2 Kloneren van delen van SHUV in E. coli*

De aanvrager is van plan individuele genen, delen van genen of volledige individuele genoomsegmenten van het SHUV te kloneren in *E. coli*. Bij deze klonering zullen de drie volledige genoomsegmenten niet tegelijkertijd in *E. coli* aanwezig zijn. Bovendien zijn er grote verschillen in translationele processing van eiwitten tussen prokaryote en eukaryote cellen en wordt het virusgenoom in de bacterie op andere wijze vermenigvuldigd. Op grond hiervan acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat tijdens de voorgenomen kloneringswerkzaamheden infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan.

Daarom adviseert de COGEM om de kloneringswerkzaamheden met individuele genen, delen van genen of volledige genoomsegmenten van SHUV in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

### 5.3 Productie van SHUV eiwitten in getransfecteerde eukaryote cellen

De aanvrager is van plan SHUV eiwitten en delen van SHUV eiwitten te produceren in eukaryote cellen. Door het ontbreken van grote delen van het genoom en verschillende andere essentiële regulatoire sequenties van SHUV (zoals de UTR's) acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat deze werkzaamheden leiden tot het ontstaan van replicatiecompetente of infectieuze replicatiedefectieve virusdeeltjes.

Daarom adviseert de COGEM om deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

### 5.4 Productie van en infectie met genetisch gemodificeerd SHUV

De aanvrager wil replicatie competente SHUV deeltjes produceren. Conform de classificatie van SHUV in pathogeniteitsklasse 2, kunnen deze werkzaamheden ingeschaald worden op ML-II inperkingsniveau.

Aangezien het zeer waarschijnlijk is dat het virus alleen via knutten of muggen verspreid kan worden, is het van belang dat er geen mogelijke vectoren aanwezig zijn. De COGEM acht de kans klein dat knutten in laboratoria aanwezig zijn. Bovendien raken deze knutten alleen door een bloedmaal besmet met virussen als het SHUV. Op basis van de wetenschappelijke literatuur zijn er op dit moment geen aanwijzingen dat aerogene transmissie of transmissie via fomites een rol speelt bij de verspreiding van het SHUV. De COGEM acht de kans derhalve zeer klein dat medewerkers tijdens werkzaamheden in het laboratorium besmet kunnen worden en het gg-SHUV via een laboratoriummedewerker in het milieu terecht komt.

Daarom adviseert de COGEM om alle open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II uit te voeren.

## 6. Referenties

1. Lee VH (1979). Isolation of viruses from field populations of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Nigeria. *J Med Entomol.* 16:76–9
2. McIntosh B (1980). The epidemiology of arthropod-borne viruses in southern Africa. Pretoria (South Africa): University of Pretoria
3. McIntosh B (1972). Annual report of the South African Institute for Medical Research, for 1972. Johannesburg (South Africa)
4. Causey OR *et al.* (1972). Isolations of Simbu group viruses in Ibadan, Nigeria 1964–69, including the new types Sango, Shamonda, Sabo and Shuni. *Ann Trop Med Parasitol.* 66:357–62
5. Van Eeden *et al.* (2012). Shuni Virus as Cause of Neurologic Disease in Horses. *Emerg Infect Dis.* 18(2): 318–321
6. Moore DL *et al.* (1975). Arthropod-borne viral infections in man in Nigeria: 1964–1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 69:49–64
7. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press

8. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
9. Amerikaanse CDC/NIH. [http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5\\_sect\\_VIII\\_f.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_VIII_f.pdf)
10. Zwitserse Federal Office for the Environment [http://www.uab.cat/Document/740/600jvirus\\_2011.pdf](http://www.uab.cat/Document/740/600jvirus_2011.pdf)
11. The Federal Institute for Occupational Safety and Health (BauA). [http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=4](http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?__blob=publicationFile&v=4) (20 februari 2013)
12. Het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP). Biosafety and Biotechnology Unit (SBB), Belgian Biosafety Server [http://www.biosafety.be/PDF/2009\\_classification\\_lists/H\\_A\\_virus.pdf](http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf) (20 februari 2013)
13. COGEM (2011). Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. COGEM advies CGM/110321-01
14. COGEM (2011). Advies inschaling productie genetisch gemodificeerd Rift Valley fever virus. COGEM advies CGM/110322-01
15. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met gg-Schmallenbergvirus. COGEM advies CGM/120829-02
16. COGEM (2013). Inschaling werkzaamheden met gg-Huaiyangshan virus. COGEM advies CGM/130502-01