

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijksma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 januari 2016
KENMERK CGM/160128-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van drie baculovirussen

Geachte mevrouw Dijksma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de classificatie van drie baculovirussen deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

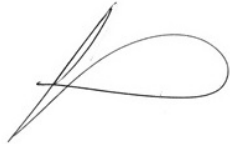
De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van drie baculovirussen. Het betreft het *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), het *Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus* (BmNPV) en het *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV). Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen als strikt dierpathogeen beschouwd kunnen worden.

AcMNPV, BmNPV en TnSNPV veroorzaken een infectie in vlindersoorten. Van deze vlindersoorten komt alleen de gastheer van TnSNPV zeer zelden voor in Nederland. Het virus wordt van rups-naar-rups overgedragen door het eten van met virus besmet plantenmateriaal. Baculovirussen worden gebruikt om rupsen van verschillende vlindersoorten te bestrijden. Tot op heden zijn deze virussen niet geassocieerd met infectie en ziekte van andere dieren of van de mens.

Op basis van de kenmerken van het virus adviseert de COGEM AcMNPV, BmNPV en TnSNPV als strikt dierpathogeen aan te merken en in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a final horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie van drie baculovirussen

COGEM advies CGM/160128-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd om alle virussen binnen de familie *Baculoviridae* te classificeren. Gezien de tijdstermijn van twee weken voor een adviesvraag kan de COGEM op dit moment niet adviseren over pathogeniteitsklasse van al deze virussen en de COGEM zal hier in een later stadium op terug komen. De COGEM is verzocht om in ieder geval te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de drie baculovirussen: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), *Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus* (BmNPV) en *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* (TnSNPV) om deze toe te voegen aan de Lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo. Tevens is de COGEM gevraagd of deze virussen als strikt dierpathogeen beschouwd kunnen worden.

Baculovirussen

De baculovirussen AcMNPV, BmNPV en TnSNPV behoren binnen de familie *Baculoviridae* tot het genus *Alphabaculovirus*.^{1,2} Baculovirussen veroorzaken ziekten bij een groot aantal verschillende soorten insecten. Infectie met deze virussen leidt tot een hoge mortaliteit. Het gastheerbereik van de meeste baculovirussen beperkt zich tot enkele insectensoorten binnen een genus of een familie.³ Alphabaculovirussen infecteren *Lepidoptera* soorten (orde van motten en vlinders).

Baculovirussen hebben een circulair dubbelstrengs DNA genoom van 80 tot 180 kbp.⁴ Het DNA van deze virussen wordt ingepakt in een nucleocapside. Eén of meerdere van deze nucleocapsiden worden omgeven door een membraan. In een polyeder zijn meerdere van deze nucleocapsidenpakketten ingepakt. Polyeders zijn grote eiwitstructuren van polyhedrine die omgeven worden door een membraan.⁴ De polyeders worden gevormd in de kern van een gastheercel en komen vrij door kern-desintegratie.⁷ Aan het eind van de virale infectie worden alleen de zogenaamde p10 en polyhedrine eiwitten in grote hoeveelheden aangemaakt.

Besmetting van rupsen door alphabaculovirussen vindt plaats door de consumptie van besmet plantenmateriaal.^{5,6} Enkele dagen na de infectie reageren de rupsen traag op aanraken en stoppen met eten. Na het overlijden van de rupsen worden ze vloeibaar, komt het virus vrij in de vorm van polyeders en wordt de plant waarop de rups overlijdt besmet met het virus.⁷ AcMNPV en andere nucleopolyhedrovirussen worden ingezet als biologische bestrijdingsmiddel in de land- en tuinbouw. Geen van deze virussen wordt geassocieerd met ziekte bij de mens.^{8,9}

Baculovirussen kunnen *in vitro* verschillende soorten zoogdiercellen infecteren en worden in laboratoria gebruikt om heterologe eiwitten tot expressie te brengen. In deze expressievectoren zijn genen geïntroduceerd in de plaats van de genen die voor p10 en polyhedrine coderen. Volgens de Regeling ggo kunnen sommige werkzaamheden met biologisch ingeperkte baculovirusexpressie systemen waarin het p10 of het polyhedrine gedeleteerd is, ingeschaald worden op ML-1 inperkingsniveau.¹⁰

Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus

AcMNPV is oorspronkelijk geïsoleerd uit de rupsen van de nachtvlinder *Autographa californica*, de ‘alfalfa looper’. Deze soort komt voor in Noord-Amerika, maar niet in Nederland.¹¹ Ook is beschreven dat verschillende andere vlindersoorten geïnfecteerd kunnen worden door AcMNPV.³ AcMNPV kan *in vitro* sommige soorten zoogdiercellen infecteren.³ Het virus wordt overgedragen via besmet plantenmateriaal en is niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus

BmNPV infecteert de zijdevlinder (*Bombyx mori*). De zijdevlinder is een gedomesticeerde soort die wordt gebruikt voor de productie van zijde. Deze vlinder komt niet in Nederland voor.¹¹ Het virus wordt overgedragen via besmet plantenmateriaal en is niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus

TnSNPV infecteert de ni-uil (*Trichoplusia ni*), ‘cabbage looper’. Dit is een nachtvlinder uit de familie *Noctuidae*. Deze soort komt wereldwijd voor, met uitzondering van de koude gebieden en Australië.¹¹ In Nederland en België is deze trekvlinder zeer zeldzaam. De laatste waarnemingen zijn in 2006, 2009 en 2015 geweest.^{12,13} Het virus wordt overgedragen via besmet plantenmateriaal en is niet geassocieerd met ziekte bij de mens.

Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Pathogeniteitsclassificatie

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico’s voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁰ 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.

Werkzaamheden met baculovirusexpressiesystemen

De COGEM merkt op dat in het inschalingsartikel 5.4.2 in Bijlage 5 van de Regeling ggo is opgenomen dat werkzaamheden met baculovirusexpressiesystemen waarin essentiële eiwitten verwijderd zijn in sommige gevallen op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden.¹⁰

Classificatie dierpathogenen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹⁴ 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.¹⁵ 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.

Inschaling in andere landen

In België zijn de *Baculoviridae* door de WIV/ISP ingedeeld in klasse 2.¹⁶ In Zwitserland is AcMNPV ingedeeld in klasse 2 en is een niet nader gespecificeerde laboratoriumstam ingedeeld in klasse 1.¹⁷

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in de afgelopen 10 jaar verschillende keren een advies uitgebracht over de inschaling van de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) baculovirussen. In 2006 en 2011 betrof het een grootschalige productie van gg-baculovirussen in insectencellen.^{18,19} In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met een baculovirussysteem waarin het haemagglutinine van het *Influenza A virus* geproduceerd werd. In 2011 betrof het de productie van het E2 eiwit van *Classical swine fever virus*. De coderende sequenties van de virale eiwitten waren op de plaats van het polyhedrine of het p10 eiwit in de baculovirussen geïnsereerd waardoor de gg-virussen in sterke mate biologisch ingeperkt werden. De COGEM achtte de risico's verwaarloosbaar klein, maar omdat het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als een groep 1 organisme, zijn de werkzaamheden, de Regeling ggo volgend, op het MI-III inperkingsniveau ingedeeld. In 2010 heeft de COGEM geadviseerd om de productie van defecte orbivirussen met een baculovirusexpressiesysteem uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.²⁰ De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van baculovirussen.

Overweging en advies

Baculovirussen worden gekenmerkt door een gastheerbereik dat beperkt is tot enkele insectensoorten binnen een genus of een familie. AcMNPV, BmNPV en TnSNPV infecteren verschillende vlindersoorten en veroorzaken een dodelijke infectie. De gastheer van TnSNPV is de afgelopen 10 jaar enkele malen in Nederland waargenomen. De gastheren van AcMNPV en BmNPV komen niet voor in Nederland. AcMNPV kan naast zijn gastheer ook ander vlindersoorten infecteren.³ Verspreiding van baculovirussen vindt plaats door het eten van besmet plantenmateriaal. Hoewel verschillende baculovirussen zoogdiercellen kunnen infecteren, zijn deze virussen nooit in verband gebracht met infectie of ziekte bij zoogdieren of bij de mens.

Op basis van de eigenschappen van AcMNPV, BmNPV en TnSNPV en alles in overweging nemende, adviseert de COGEM deze virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en aan te merken als strikt dierpathogeen.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses Master Species List (2014) v4.
http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208.aspx (bezoekt: 14 januari 2016)
2. Jehle JA *et al.* (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 151: 1257-1266

3. Gröner A (1986). Specificity and safety of baculoviruses. In: The Biology of Baculoviruses, Vol. 1, Biological Properties and Molecular Biology. Eds. Granados RR & Federici BA, CRC Press, Boca Raton
4. Herniou EA *et al.* (2012). Family Baculoviridae. In: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
5. Zhou M *et al.* (2005). Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolydnavirus. J. Invertebr. Pathol. 89: 165-175
6. Van Loo ND *et al.* (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. J. Virol. 75: 961-970
7. Friesen PD. (2013). Insect Viruses. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
8. Ma S *et al.* (2015). Molecular and Physiological Characterization of Two Novel Multirepeat β -Thymosins from Silkworm, *Bombyx mori*. PLoS One. 10:e0140182. doi: 10.1371/journal.pone.0140182
9. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) (2006). Safety Assessment of Transgenic Organisms, Volume 2: OECD Consensus Documents, Section 1 - Baculoviruses. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264095403-9-en>. (bezoekt: 19 januari 2016)
10. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. www.officiëlebekeendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html (bezoekt: 21 januari 2016)
11. Savelle M. Lepidoptera and some other life forms. www.funet.fi/pub/sci/bio/life (bezoekt 21 januari 2016)
12. Vlindernet (2014). Ni-uil (*Trichoplusia ni*). www.vlindernet.nl/vlindersoort.php?vlinderid=864 (bezoekt: 21 januari 2016)
13. Vlinderstichting (2015). Nieuws. Let op zeer zeldzame ni-uil tussen de gamma's. www.vlinderstichting.nl/let-op-zeer-zeldzame-ni-uil-tussen-de-gammas (bezoekt: 25 januari 2016)
14. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
15. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
16. Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid/ Institut Scientifique de Santé Public (WIV-ISP) (2008). List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (bezoekt: 21 januari september 2015)
17. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013 www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezoekt: 21 januari 2015)
18. COGEM (2006). Grootschalige productie van een vaccincomponent. COGEM advies CGM/060518-04

19. COGEM (2011). Productie van CSFV E2 en PCV manteleiwit met behulp van een baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor. COGEM advies CGM/111128-02
20. COGEM (2010). Classificatie en inschaling werkzaamheden met recombinante Orbivirussen. COGEM advies CGM/100712-05