

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

DATUM 14 november 2022
KENMERK CGM/221114-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie diaphorina citri picorna-like virus

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 22-146_2.8-000 getiteld '2.8 *in vitro* transcriptie en infectie van insecten cellijnen met 'Diaphorina citri picorna-like virus', ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het 'Diaphorina citri picorna-like virus' (DcPLV). Tevens is de COGEM gevraagd of DcPLV als een insect-specifiek en strikt dierpathogeen virus kan worden beschouwd.

DcPLV is voor het eerst gedetecteerd in populaties van de Aziatische bladvlo *Diaphorina citri* afkomstig uit China, Taiwan, Brazilië en Florida. Deze bladvlo draagt bij aan de verspreiding van een bacterie die de ziekte 'citrusvergroening' veroorzaakt, wat grote schade veroorzaakt aan citrusbomen. Het is nog niet duidelijk tot welke familie of geslacht het virus DcPLV hoort, maar onderzoeken tonen aan dat het virus het meest nauw verwant is aan de familie van de *Iflaviridae*. Virussen behorende tot de familie *Iflaviridae* zijn insect-specifieke virussen die geen ziekte in mensen, planten of andere dieren dan insecten veroorzaken. Voor zover bij de COGEM bekend, is DcPLV niet in staat om andere organismen dan insecten te infecteren.

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat DcPLV als een strikt insect-specifiek virus gekenmerkt kan worden. De COGEM adviseert derhalve om DcPLV 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 belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Pathogeniteitsclassificatie van het *Diaphorina citri* picorna-like virus (DcPLV)

COGEM advies CGM/221114-01

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van een verzoek van Wageningen Universiteit (IG 22-146) gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie (Appendix I) van *Diaphorina citri* picorna-like virus (DcPLV). Tevens is de COGEM gevraagd of DcPLV als een strikt dierpathogeen (Appendix II) en insect-specifiek (appendix III) virus kan worden beschouwd.

2. *Diaphorina citri* picorna-like virus (DcPLV)

De orde van de *Picornavirales* bestaat uit acht families: de *Caliciviridae*, *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polycipiviridae*, *Secoviridae*, en de *Solinviviridae*.¹ Virussen die tot deze orde behoren hebben een positief, enkelstrengs RNA genoom, dat één tot vijf open leesramen ('open reading frames', ORFs) bevat, en produceren icosahedrische virusdeeltjes.² Virussen waarvan onduidelijk is tot welke familie of genus ze behoren, maar overeenkomsten met de *Picornavirales* vertonen op basis van de genoomeigenschappen en de structuur van de virusdeeltjes, worden vaak beschreven als 'picorna-like' virussen.^{3,4}

Het virus '*Diaphorina citri* picorna-like virus' (DcPLV) is in 2016 voor het eerst beschreven naar aanleiding van metagenomische analyses uitgevoerd op populaties van de bladvlo *Diaphorina citri* ('Asian citrus psyllid').⁴ De bladvlo *Diaphorina citri* is een vector voor *Candidatus Liberibacter asiaticus*, een genus van bacteriën die de ziekte 'Huanglongbing' (HLB), ook wel bekend als 'citrusvergroening' of 'citrus greening disease', veroorzaakt.^{5,6} Deze ziekte veroorzaakt grote schade aan citrusbomen en is inheems in Azië. Een Amerikaanse variant van deze ziekte is inmiddels aanwezig in Zuid-Amerika, Mexico en delen van de Verenigde Staten.^{7,8}

DcPLV werd aangetroffen in *D. citri* populaties afkomstig van citrusbomen in Brazilië, China en Taiwan⁴, maar is in 2020 ook gevonden in *D. citri* populaties afkomstig uit citrusbomen in Florida.⁹

DcPLV is een enkelstrengs, positiefstrengs RNA-virus met een genoomgrootte van ca. 10 kb. Het genoom bevat één enkel open leesraam ('open reading frame', ORF) waarbij er één polyproteïne wordt geproduceerd.⁴ DcPLV vertoont minder dan 40% overeenkomst op aminozuurniveau met virussen uit de familie *Iflaviridae*, en heeft een andere genoomorganisatie. Bij DcPLV bevinden de structurele eiwitten zich, in tegenstelling tot Iflavirussen, C-terminaal van de niet-structurele eiwitten, waardoor de genoomorganisatie van DcPLV meer overeenkomt met de genoomorganisatie van *Heterosigma akashiwo* RNA virus (HaRNAV) behorende tot de familie *Marnaviridae*.^{4,10} Op basis van fylogenetische vergelijkingen gebaseerd op het 'RNA-dependent RNA-polymerase' (RdRp) verschillen DcPLV en HaRNAV echter van elkaar, en lijkt DcPLV het meeste op het *Iflavirus* 'Deformed wing virus', dat pathogeen is voor honingbijen.⁴ Tussen DcPLV en het Deformed wing virus is echter maximaal 33% overeenkomst op aminozuurniveau gevonden. Op basis van de fylogenetische analyse van het RNA-

polymerase wordt gesteld dat DcPLV nauw verwant is aan de *Iflaviridae*.⁴ Ander onderzoek toonde aan dat de genomorganisatie van DcPLV overeenkomstig is met ‘*Bactericera cockerelli* picorna-like virus’ (BcPLV), geïsoleerd uit de bladvlo *Bactericera cockerelli* die voorkomt op aardappelen en tomaten.¹¹ Uit fylogenetische vergelijkingen blijkt dat de RNA-polymerases van BcPLV en DcPLV nauw verwant aan elkaar zijn en binnen de *Iflaviridae* een apart cluster vormen.¹¹

Eerder COGEM advies

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.¹² 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 2.¹³

Overweging en advies

DcPLV is een picorna-like virus dat de (Aziatische) bladvlo *Diaphorina citri* als gastheer heeft. Het virus is aangetroffen in *D. citri* populaties uit citrusgaarden in China, Taiwan, Brazilië en Florida.^{4,9} Het is niet duidelijk tot welke familie en welk genus DcPLV hoort, maar het virus vertoont op basis van fylogenetische vergelijkingen overeenkomsten met de *Iflaviridae*, terwijl de genomorganisatie lijkt op de *Marnaviridae*.^{4,11} Virussen behorende tot de *Marnaviridae* infecteren unicellulaire eukaryoten zoals micro-algen.^{14,15} Virussen behorende tot de familie *Iflaviridae* worden op basis van de resultaten van een onderzoek, uitgevoerd in opdracht van de COGEM, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{12,13} Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen aanwijzingen dat DcPLV in staat is mensen, planten of andere dieren dan insecten te infecteren.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat DcPLV als een strikt insect-specifiek virus gekenmerkt kan worden. De COGEM adviseert derhalve om DcPLV als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Appendix I. Pathogeniteitsclassificatie Regeling 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.

Appendix II. 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.¹⁶ 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.¹⁷ 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.

Appendix III. 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 te 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-specifiek virussen.¹² 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 2.¹³

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), [Current ICTV Taxonomy Release | ICTV](#) (bezocht: 4 november 2022)
2. Zell R *et al.* (2022). Picorna-like viruses of the Havel river, Germany. *Front. Microbiol.* 13: 865287
3. Koonin EV *et al.* (2008). The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 925–939.
4. Nouri S *et al.* (2016). Diverse array of new viral sequences identified in worldwide populations of the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) using viral metagenomics. *J. Virol* 90: 2434-2445
5. Grafton-Cardwell EE *et al.* (2013). Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the Huanglongbing pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 413–432.
6. Da Graca JV (2013). Etiology, history, worldwide situation of Huanglongbing. 3rd Int Citrus Quarantine Pest Workshop, Manzanillo, Mexico.
7. Coletta-Filho HD *et al.* (2004). First report of the causal agent of Huanglongbing (“Candidatus Liberibacter asiaticus”) in Brazil. *Plant Dis.* 88:13823
8. Sutton B *et al.* (2005). Detection and identification of citrus huanglongbing (greening) in Florida, USA, workshop H11. Second Int Citrus Canker Huanglongbing Res Workshop, Orlando, FL.

9. Britt K *et al.* (2020). The detection and surveillance of Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) – associated viruses in Florida citrus groves.
10. Lang AS *et al.* (2004). Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Virology* 320:206–217.
11. Dahan J *et al.* (2022). A new picorna-like virus identified in populations of the potato psyllid *Bactericera cockerelli*. *Arch. Virol.* 167: 177-182
12. Vlak J (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. COGEM onderzoeksrapport CGM 2019-01
13. COGEM (2019). Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
14. Wolf YL *et al.* (2020). Doubling of the known set of RNA viruses by metagenomic analysis of an aquatic virome. *Nat. Microbiol.* 5: 1262-1270
15. Vlok M *et al.* (2019). Application of a sequence-based taxonomic classification method to uncultured and unclassified marine single-stranded RNA viruses in the order Picornavirales. *Virus Evol.* 5: vez056
16. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
17. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02