

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 25 januari 2012
KENMERK CGM/120125-01
ONDERWERP Advies classificatie van Canine parvovirus

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 11-085 met de titel 'Evaluatie van Parvovirusmutanten' van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het Canine parvovirus (CPV) en werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) CPV vaccinstam.

CPV veroorzaakt acute en soms fatale darmontsteking (enteritis) bij jonge honden. De symptomen van deze ziekte bestaan uit braken, slijmerige of bloederige diarree en gewichtsverlies. Een infectie van volwassen honden verloopt in de meeste gevallen zonder symptomen.

Verspreiding van het virus onder honden vindt hoofdzakelijk plaats via gecontamineerde feces, grond en gebruiksvorwerpen. Er zijn geen gegevens bekend die erop wijzen dat CPV mensen kan infecteren. Daarnaast zijn er commerciële vaccins beschikbaar die preventief worden toegepast om ziekte en infectie bij honden tegen te gaan. Op basis van deze gegevens adviseert de COGEM CPV te classificeren als een klasse 2 dierpathogeen.

De aanvrager wil gg-CPV in verschillende cellijnen opkweken voor de ontwikkeling van een vaccin. Het gg-CPV wordt verkregen vanuit het buitenland. Op basis van de resultaten van vaccinatieproeven in jonge Beagles is de COGEM van mening dat de gg-CPV vaccinstam geattenuerd is.

Op grond van de inschaling van CPV in pathogeniteitsklasse 2 kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder genoemde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-CPV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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 large, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij



Classificatie van Canine parvovirus

COGEM advies CGM/120125-01

Inleiding

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over de classificatie van het Canine parvovirus (CPV) en de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) CPV vaccinstam. De aanvrager, Intervet International B.V., wil gg-CPV opkweken in verschillende cellijnen afkomstig van honden en katten om condities te ontwikkelen waarbij optimale titers van het virus worden behaald. Het gg-CPV moet dienst doen als levend geattenuerd vaccin tegen parvovirusinfecties bij honden. De gg-virusstam wordt verkregen vanuit het buitenland.

Canine parvovirus

CPV behoort tot de familie *Parvoviridae*, genus *Parvovirus* en de soort *Feline Panleukopenia virus* (FPV), waartoe ook het FPV, Mink enteritis virus (MEV) en Raccoon parvovirus (RPV) behoren. CPV is niet verwant aan het *Canine minute virus* dat voorheen bekend stond als *Canine parvovirus type 1* (CPV-1).¹ De oorspronkelijke CPV virusstam, aangeduid als CPV-2, werd in 1978 ontdekt als ziekteverwekker bij honden. Waarschijnlijk is deze stam ontstaan vanuit het Feline panleukopenia virus dat katten infecteert.^{1,2} De sprong van de kat naar de hond als gastheer is vermoedelijk verlopen via tussenliggende passages in andere carnivoren, zoals nertsen, wasberen en vossen.^{2,3}

Kort na het verschijnen van CPV-2 werden er twee antigene varianten van het virus (CPV-2a, CPV-2b) ontdekt die zich inmiddels wereldwijd hebben verspreid en de oorspronkelijke stam hebben verdrongen.² Daarnaast werd er in het jaar 2000 in Italië een derde variant, CPV-2c, ontdekt. De antigene varianten zijn ontstaan door een beperkt aantal aminozuurveranderingen in het capsid eiwit van CPV-2.¹ Deze varianten zijn pathogener dan het oorspronkelijke virus en kunnen, in tegenstelling tot de oorspronkelijke stam, tevens katten infecteren.¹ Er zijn gevallen bekend waarbij katten ziek zijn geworden als gevolg van een infectie met een CPV-2 variant.¹ Er zijn in de literatuur geen gegevens bekend die er op wijzen dat CPV pathogeen is voor de mens.

CPV veroorzaakt acute en soms fatale darmontsteking (enteritis) bij puppies. De infectie van volwassen honden verloopt in de meeste gevallen asymptomatisch. De hevigheid van de ziekte is afhankelijk van de hoeveelheid maternale antistoffen tegen het virus op het moment van infectie.¹ In puppies die geen maternale antistoffen hebben kan het virus ook een fatale ontsteking van de hartspier veroorzaken.¹ De klinische symptomen van enteritis treden op na een incubatietijd van enkele dagen en bestaan uit braken, slijmerige of bloederige diarree en gewichtsverlies. Verspreiding onder honden vindt hoofdzakelijk plaats via gecontamineerde feces, grond en gebruiksvorwerpen zoals deurklinken, instrumenten en werkoppervlakken. Het virus is zeer

bestand tegen veranderingen in zuurgraad en temperatuur en kan maandenlang in het milieu overleven.¹

In Nederland en andere landen worden puppies doorgaans gevaccineerd tegen CPV infecties. De vaccins, bestaande uit levend geattenueerde CPV-2 of CPV-2b virusstammen, worden doorgaans in de eerste twaalf weken aan de honden toegediend.^{1,2} Hoewel de vaccins bescherming bieden tegen infectie en ziekte kan de immunisatie soms ontoereikend zijn door tegenwerking van een hoge concentratie aan maternale antistoffen.⁴

Genomische organisatie van CPV

Het genoom van CPV bestaat uit een lineair, enkelstrengs DNA molecuul van ongeveer 5000 basenparen.⁵ Aan beide uiteinden van het genoom bevinden zich palindromische sequenties van 100 tot 300 nucleotiden die een 'hairpin'-structuur vormen. Het genoom codeert voor twee niet-structurele eiwitten (NS1 en NS2) en twee structurele eiwitten (VP1 en VP2). In de gastheer wordt nog een derde structureel eiwit gevormd door splitsing van VP2 met behulp van gastheerproteasen.¹ Bijna 90% van het virusdeeltje bestaat uit VP2, waardoor dit eiwit in grote mate bepalend is voor het gastheerbereik van het virus en de interacties met de gastheer.¹

Eerder advies

De COGEM heeft werkzaamheden met gg-CPV nog niet eerder beoordeeld. In België wordt CPV als dierpathogeen van klasse 2 beschouwd.⁶

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil gg-CPV opkweken in verschillende cellijnen afkomstig van katten en honden om condities te ontwikkelen waarbij optimale titers van het virus worden behaald. Tot de werkzaamheden zullen ook microscopisch onderzoek en vriesdrogen behoren. Afhankelijk van de behaalde titer wordt het geproduceerde virus geconcentreerd. Het gg-CPV moet dienst doen als levend geattenuerd vaccin tegen parvovirusinfecties bij honden. De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitvoeren.

Tijdens de werkzaamheden zal er gebruik worden gemaakt van een gg-CPV virusstam afkomstig uit het buitenland, genaamd CPV 630att. Dit gg-virus is gebaseerd op de geattenueerde backbone van vaccinstam CPV 154att en het VP2 manteleiwitgen van een CPV-2c veldisolaat. De attenuatie in vaccinstam CPV 154att berust op mutaties in de NS1 regio en twee aminozuurveranderingen in de VP2 regio. De CPV-2c stam is geïsoleerd uit de feces van een zieke hond in de VS.

De gg-vaccinstam is geproduceerd via reassorties waarbij het VP2 gen afkomstig uit het CPV-2c isolaat en de geattenueerde backbone van CPV 154att zijn samengevoegd. Een deel van het VP2 gen is chemisch gesynthetiseerd waarbij mutaties zijn aangebracht die ook in de oorspronkelijke CPV 154att vaccinstam voorkomen, maar niet in het veldisolaat.

Classificatie

De Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (Regeling GGO) voorziet in maatregelen om

mens en milieu te beschermen bij de vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde organismen. Virussen zijn op basis van hun pathogeniteit ingedeeld in vier klassen. Deze indeling is gebaseerd op criteria voor humane pathogenen. In het geval van dierpathogene virussen zijn deze criteria niet toereikend, omdat dierpathogenen in de meeste gevallen geen bedreiging vormen voor de mens.

In 2006 heeft de COGEM een aantal speciale criteria geformuleerd met betrekking tot dierpathogenen.⁷ De COGEM heeft geadviseerd ggo-activiteiten met dierpathogene virussen in te delen in vier pathogeniteitsklassen, waarbij criteria worden gehanteerd die betrekking hebben op het dierpathogene karakter en de milieurisico's, zoals verspreidingsroute, de overleving van het pathogeen in het milieu, de mate van besmettelijkheid en de mortaliteit. Bij elke pathogeniteitsklasse heeft de COGEM inperkende maatregelen aangegeven die essentieel zijn om verspreiding naar het milieu tegen te gaan. Deze inrichtingsvoorschriften kunnen afwijken van de voorschriften voor werkzaamheden met humaan pathogeen, aangezien dierpathogene virussen in de meeste gevallen geen ziekte kunnen veroorzaken in mensen en bescherming van de laboratoriummedewerker daarom niet aan de orde is.

De COGEM onderscheidt de volgende vier pathogeniteitsklassen voor dierpathogene virussen op basis van de aangegeven criteria:

Dierpathogeen virus van klasse 1: Het virus of de virusstam wordt gebruikt als vaccinatiemiddel, of is niet pathogeen en leidt niet tot een ziektebeeld.

Dierpathogeen virus van klasse 2: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is over het algemeen in het milieu aanwezig (enzoötisch), waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu gering zijn;
- Vectoren spelen geen rol in de transmissie;
- Op populatieniveau is er beperkte transmissie door direct contact;
- Er treedt geen aërogene transmissie van belang op;
- Het virus persisteert niet buiten de gastheer;
- De mortaliteit is veelal gering;
- Een effectief vaccin is beschikbaar en wordt in de praktijk toegepast.

Dierpathogeen virus van klasse 3: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren een ernstige ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is niet enzoötisch aanwezig, waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn;
- Vectortransmissie is mogelijk;
- Op populatieniveau is er relatief gemakkelijke transmissie door direct contact;
- Aërogene transmissie kan voorkomen;

- Indirecte transmissie is mogelijk via bijvoorbeeld personen, transportmiddelen, afval en dierlijke producten;
- Het virus kan buiten de gastheer persisteren;
- De mortaliteit kan hoog zijn;
- Er is geen effectief vaccin beschikbaar of preventieve vaccinatie vindt in de praktijk niet plaats.

Dierpathogeen virus van klasse 4: Het virus of de virusstam veroorzaakt bij dieren een zeer ernstige ziekte, omdat het virus voldoet aan de meeste van de volgende criteria:

- Het virus is niet enzoötisch aanwezig waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu zeer ernstig zijn;
- Vectortransmissie is mogelijk;
- Op populatieniveau is er zeer gemakkelijk transmissie door direct contact;
- Aërogene transmissie kan bij sommige virussen een grote rol spelen;
- Als gevolg van het gastheerbereik van het virus kan er gemakkelijk transmissie tussen soorten optreden;
- Indirecte transmissie via personen, transportmiddelen, afval en dierlijke producten speelt een belangrijke rol;
- Het virus kan buiten de gastheer makkelijk persisteren;
- De mortaliteit kan hoog zijn;
- Er is geen effectief vaccin beschikbaar of preventieve vaccinatie vindt in de praktijk niet plaats.

Overweging en advies

Classificatie CPV

CPV veroorzaakt acute en soms fatale darmontsteking in honden. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat CPV pathogeen is voor katten.¹ Er zijn geen aanwijzingen dat CPV pathogeen is voor de mens. De verspreiding onder honden vindt hoofdzakelijk plaats via gecontamineerde feces, grond en gebruiksvorwerpen. Er zijn geen gegevens bekend die erop wijzen dat CPV zoönotisch potentieel heeft. Daarnaast zijn er commerciële vaccins beschikbaar die preventief worden toegepast om ziekte en infectie bij honden tegen te gaan. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de classificatie van CPV als een klasse 2 dierpathogeen gerechtvaardigd.

Werkzaamheden met gg-CPV

De aanvrager zal gg-CPV gebruiken dat is samengesteld uit het manteleiwitgen van een virulent veldisolaat van CPV-2c en de geattenueerde backbone van vaccinstam CPV 154att. Deze vaccinstam is volgens de aanvrager al meer dan 30 jaar op de markt. In het manteleiwitgen van het CPV-2c veldisolaat zijn mutaties aangebracht die ook in de oorspronkelijke geattenueerde vaccinstam CPV 154att voorkomen. Deze mutaties hebben een verdere attenuering van het virus tot doel. In de ogen van de COGEM zijn er geen aanwijzingen dat het gebruikte gg-CPV een hogere pathogeniteit heeft dan het uitgangsvirus. De aanvrager heeft gegevens aangeleverd

waaruit blijkt dat het CPV 630att vaccin veilig is voor Beagle pups afkomstig van ongevaccineerde moeders. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de gg-CPV vaccinstam geattenuëerd is.

Op grond van de inschaling van CPV in pathogeniteitsklasse 2 kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met gg-CPV 630att op ML-II inperkingsniveau. Gezien de mogelijke verspreiding via gebruiksvorwerpen vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. Daarnaast is het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden verplicht.

Onder het hierboven genoemde inperkingsniveau en de aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met de gg-CPV 630att stam voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Deacro N & Buonavoglia C (2011). Canine parvovirus – A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* Ahead of print
2. Truyen U (2006). Evolution of canine parvovirus- a need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 117: 9-13
3. Spibey N *et al.* (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 128: 48-55
4. Decaro N *et al.* (2008). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31:125-130
5. Muzycka N & Berns K (2001). *Parvoviridae: The viruses and their replication.* In: Fields virology, volume two, fourth edition. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
6. Belgian Biosafety Server (http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf) (januari 2012)
7. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04