

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 02 december 2013  
**KENMERK** CGM/131202-01  
**ONDERWERP** Advies: Classificatie van *Phocine distemper virus*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 01-287 met de titel 'Onderzoek aan mazelenvirus' van het Erasmus Medisch Centrum te Rotterdam deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Phocine distemper virus* (PDV). Tevens is de COGEM verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop *in vitro* experimenten met genetisch gemodificeerde (gg-)PDV deeltjes ingeschaald dienen te worden.

PDV veroorzaakt een ernstige ziekte in zeehonden, met een hoge mortaliteit. Uitbraken vertonen een cyclisch patroon, de laatste uitbraken waren in 1988 en 2002. Er zijn aanwijzingen dat het virus ook honden, nertsen en zeeotters kan infecteren. Het virus wordt voornamelijk overgedragen via aerosolen, maar andere routes zijn niet uitgesloten.

Aangezien PDV een enzoïtisch karakter heeft en er een vaccin beschikbaar is, adviseert de COGEM PDV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM adviseert de productie van en werkzaamheden met replicatiecompetente infectieuze gg-PDV deeltjes en de werkzaamheden met deze deeltjes in te schalen op ML-II inperkingsniveau.

Tijdens de productie van replicatiecompetent infectieus PDV wordt gebruik gemaakt van genen van het *Measles virus* (MV). De COGEM is van mening dat de verkregen virussen gesequenced moeten worden, teneinde recombinante virusdeeltjes waarin tijdens de productie van gg-PDV onbedoeld sequenties van MV terecht gekomen zijn, uit te sluiten van vervollexperimenten.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu onder het genoemde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-PDV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

*Met het oog op eventuele belangverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Classificatie van *Phocine distemper virus*

## COGEM advies CGM/131202-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Phocine distemper virus* (PDV) en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)PDV. Het Erasmus Universitair Medisch Centrum vraagt een wijziging aan van vergunning IG 02-287 met de titel ‘Onderzoek aan mazelenvirus’. Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is om een “reverse genetics” systeem te ontwikkelen voor de productie van gg-PDV deeltjes. Deze deeltjes zullen worden gebruikt voor fundamenteel onderzoek naar de overeenkomsten en verschillen tussen het *Measles virus* (MV), *Canine distemper virus* (CDV) en PDV.

### Morbillivirus

PDV behoort tot het genus *Morbillivirus* en de familie *Paramyxoviridae*. Tot dit genus behoren ook het CDV, het *Rinderpestvirus*, het *Peste-des-Petits-Ruminants virus* en het voor mensen zeer infectieuze MV. Morbillivirus-infecties veroorzaken wereldwijd significante mortaliteit in mensen en dieren.<sup>1</sup> Op basis van sequentieovereenkomst vertoont PDV de meeste overeenkomst met CDV.

CDV infecteert leden van de orde *Carnivora*, waaronder honden, vossen, fretten, dassen, stinkdieren en leeuwen. Er is een vaccin beschikbaar tegen CDV. Het *Rinderpestvirus* en het *Peste-des-Petits-Ruminants virus* veroorzaken een hoge mortaliteit in onder andere runderen, buffels, varkens, schapen en geiten. Het MV is, ondanks de beschikbaarheid van een veilig en kosteneffectief vaccin, jaarlijks verantwoordelijk voor grote kindersterfte. Meer dan 95% van deze sterfgevallen vindt plaats in lage-inkomenslanden met een slecht ontwikkelde gezondheidszorg.<sup>2</sup>

### *Phocine distemper virus*

PDV is voor het eerst geïdentificeerd in 1988 tijdens een uitbraak in zeehonden in de Noordzee. Tijdens deze uitbraak zijn 17.000 – 20.000 zeehonden gestorven.<sup>3</sup> Het virus is enzoïtisch in zeehonden in de Arctische wateren.<sup>4</sup> Mogelijk is de zadelrob (*Phoca groenlandica*) de gastheer van het virus en is de uitbraak van 1988 ontstaan door migratie van een groot aantal zadelrobben.<sup>5</sup> Een tweede uitbraak in 2002 resulteerde in de sterfte van 22.000 – 30.000 zeehonden.<sup>6</sup> Vooral gewone zeehonden (*Phoca vitulina*) zijn erg vatbaar voor PDV, tijdens de uitbraak in 1988 is iets meer dan de helft van de populatie overleden.

Na de uitbraak van 2002 was ongeveer 87% van de zeehondenpopulatie immuun. Om dit moment wordt geschat dat 11% van de zeehondenpopulatie (volwassen dieren en zogende pups) in de Waddenzee neutraliserende antilichamen heeft. De ziekte-uitbraken vertonen een cyclisch karakter, omdat de populatie-immuniteit na verloop van tijd terugloopt.<sup>7</sup> De verwachting is dat bij een nieuwe uitbraak van PDV een groot percentage van de zeehonden ziek zal worden. In de wetenschappelijke literatuur wordt geschat dat 50% van de populatie zeehonden in de Waddenzee zal overlijden, net als bij de uitbraken in 1988 en 2002.<sup>7</sup>

Infectie van grijze zeehonden (*Halichoerus grypus*) met PDV kent over het algemeen een minder ernstig ziekteverloop. Infecties met PDV zijn ook waargenomen bij zeehonden in Canada, de VS en Schotland.<sup>4,8,9</sup> Behalve zeehonden, zijn er ook aanwijzingen dat andere PDV carnivoren kan infecteren zoals honden en nertsen.<sup>10</sup> In Alaska is een virus geïsoleerd bij zeeotters (*Enhydra lutris*) die zeer grote overeenkomst vertoont met PDV. Van de gevangen zeeotters was 40% seropositief voor antilichamen tegen dit PDV-ervante virus.<sup>11</sup>

PDV veroorzaakt respiratoire, gastro-intestinale en neurologische symptomen, zoals koorts, hoesten, moeite met ademen, diarree, conjunctivitis, keratitis en moeite met duiken (stabiliteit in het water). Infectie met het PDV kan het immuunsysteem beïnvloeden, waardoor de zeehond bevattelijker wordt voor secundaire infecties met hoge mortaliteit tot gevolg.

De transmissie van PDV vindt vooral plaats via aerosolen. Mogelijk vindt er ook overdracht van het virus plaats via eten (of besnuffelen) van karkassen en/of uitwerpselen. Vectoren spelen geen rol in de verspreiding van het virus.

Momenteel bestaan er geen medicatie tegen PDV. Wel bestaat de mogelijkheid om zeehonden te vaccineren met een vaccin tegen CDV. Doordat beide virussen nauw verwant zijn, bestaat er kruisimmunitet. Vaccinatie van zeehonden wordt toegepast bij dieren in gevangenschap.

#### *Genomische organisatie*

PDV wordt omgeven door een lipidemembraan en heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom bevat zes genen die coderen voor 8 eiwitten. De structurele eiwitten zijn ‘nucleocapside’ (N), ‘phospho’ (P), ‘matrix’ (M), ‘fusion’ (F), ‘haemagglutinine’ (H) en ‘large’ (L) en de niet-structurele eiwitten zijn C en V. Het nucleocapside eiwit vormt samen met het RNA genoom en het RNA-afhankelijke RNA polymerase, bestaande uit de P- en L-eiwitten, een zogenaamd ribonucleoproteïne complex. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De glycoproteïnes H en F bevinden zich in het lipidemembraan. Het H-eiwit is verantwoordelijk voor verankering van het virus aan de gastheercel. Het F-eiwit zorgt voor fusie met het celmembraan van de gastheercel.

#### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens replicatiecompetente, infectieuze gg-PDV virusdeeltjes te produceren. Hiertoe wil de aanvrager een moleculaire kloon van PDV maken die ‘Enhanced Green Fluorescent Protein’ (EGFP) of een andere fluorescent eiwit (HcRed1, Venus, tagBFP, dTom, mCherry) tot expressie brengt.

Deze virusdeeltjes worden verkregen door productiecellen te transfecteren met een construct die de volledige antigenomische sequentie van PDV bevat en drie helper-plasmiden die de MV genen phosphoproteïne (P), nucleoproteïne (N) en large proteïne (L) tot expressie brengen, al deze constructen bevatten een T7 promotor. Vervolgens worden de getransfecteerde cellen geïnfecteerd met een T7 polymerase expresserende fowlpox vector (FPV-T7). De aanvrager geeft aan dat geproduceerde virusdeeltjes gesequenced zullen worden en dat recombinante gg-PDV deeltjes waarvan het genoom delen van PDV en MV bevat, uitgesloten worden van vervolgstudies. De geproduceerde virusdeeltjes zullen vervolgens gebruikt worden om animale cellen te infecteren.

## 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 (GGO) en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.<sup>12</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 in de Regeling GGO 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.

Het Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)' heeft PDV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>13</sup> Het Belgische Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) heeft PDV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>14</sup>

## **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met PDV. In 2012 heeft de COGEM geadviseerd over het nauw verwante virus CDV en dit ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2.<sup>15</sup> In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van twee andere Morbillivirussen: het *Rinderpestvirus* en het *Peste-des-Petits-Ruminants virus*. Beide virussen zijn ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3.<sup>16</sup> MV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>17</sup>

## **Overweging en advies**

### *Classificatie van PDV*

Het virus veroorzaakt verschillende respiratoire, gastro-intestinale en neurologische symptomen. Als gevolg van immuunsuppressie kunnen secundaire infecties leiden tot een hoge mortaliteit. Overdracht van het virus vindt voornamelijk plaats via aerosolen. Overdracht via alternatieve routes zoals het besnuffelen van karkassen en ontlasting zijn niet uitgesloten. Overdracht vindt niet plaats via vectoren.

De uitbraken van PDV vertonen een cyclisch karakter. Op het moment dat het aantal dieren met neutraliseren antilichamen in de populatie afneemt en er een verminderde populatie-immuniteit is, neemt het risico op een nieuwe uitbraak toe.

Er is een vaccin beschikbaar dat in de praktijk wordt toegepast bij dieren in gevangenschap. Naast zeehonden kunnen honden mogelijk geïnfecteerd worden met PDV, maar doordat honden gevaccineerd worden tegen CDV en er kruisimmunitet bestaat tussen CDV en PDV, zijn honden beschermd tegen een infectie met PDV. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat PDV infecties kan veroorzaken bij mens.

In de Waddenzee komen uitbraken van PDV cyclisch voor bij zeehonden, daarmee heeft PDV een enzoëtisch karakter. Er is populatie-immuniteit in de hond. Er is een vaccin beschikbaar. Op grond van deze argumenten adviseert de COGEM het PDV in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

### *gg-PDV*

De aanvrager is van plan infectieuze replicatiecompetente virusdeeltjes te produceren. Hiertoe produceert de aanvrager een moleculaire kloon van PDV die een fluorescent eiwit tot expressie brengt. Deze kloon wordt getransfecteerd samen met een drietal helper-plasmiden die coderen voor de genen P, N en L van het MV. In theorie kan er tijdens de productie van infectieuze gg-PDV deeltjes een recombinant virus ontstaan, waarvan het genoom sequenties bevat van zowel PDV als MV. De COGEM is van mening dat de verkregen virusdeeltjes gesequenced moeten worden om uit te sluiten dat er met recombinant virus gewerkt wordt.

Op grond van de classificatie van PDV in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de werkzaamheden betreffende gg-PDV op ML-II inperkingsniveau in te schalen en stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen om uitsleep van het virus naar het milieu te voorkomen.

- Open handelingen moeten in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd worden.
- Het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht.

Onder dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorwaarden is de COGEM van mening dat de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden met gg-PDV voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. 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
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/> (februari 2013)
3. Visser IKG *et al.* (1993). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Vet Res.* 24(2):169-78
4. Duignan PJ *et al.* (1997). Epizootiology of morbillivirus infection in harp, hooded, and ringed seals from the Canadian Arctic and western Atlantic. *J Wildl Dis.* 33(1):7-19
5. Markussen NH & Have P (1992). Phocine distemper virus infection in harp seals (*Phoca groenlandica*). *Marine mammal science* 8:19-26
6. Rijks JM *et al.* (2002). Phocine distemper outbreak, The Netherlands, 2002. *Emerg Infect Dis.* (12):1945-8
7. Bodewes R *et al.* (2013). Prevalence of phocine distemper virus specific antibodies: bracing for the next seal epizootic in north-western Europe. *Emerg Microbes Infect.* 2(1): e3
8. Earle PJA *et al.* (2011). Phocine distemper virus in seals, east coast, United States, 2006. *Emerg Infect Dis.* 17(2):215-20
9. Thompson PM *et al.* (1992). Serologic study of phocine distemper in a population of harbor seals in Scotland. *J Wildl Dis.* 28(1):21-7
10. Barrett T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 69(1-2):3-13
11. Goldstein T *et al.* (2009). Phocine distemper virus in northern sea otters in the Pacific Ocean, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis.* 15(6):925-7
12. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
13. 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)
14. 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)
15. COGEM (2010). Classificatie van Canine distemper virus. COGEM advies CGM/100616-01
16. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
17. COGEM (2013). Classificatie humaan- en dierpathogene RNA virussen. COGEM advies CGM/131031-02