

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordering en Milieubeheer  
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 16 juni 2010  
**KENMERK** CGM/100616-01  
**ONDERWERP** Advies: Classificatie van Canine distemper virus

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

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

### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van het *Canine distemper virus* (CDV). Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde CDV stammen ingeschaald dienen te worden.

CDV veroorzaakt ziekte in wilde en gedomesticeerde dieren van de orde *Carnivora*, waaronder honden. In veel gevallen is het ziekteverloop zeer ongunstig en zal de geïnfecteerde gastheer sterven aan de infectie of hier blijvend letsel aan overhouden. Een infectie van mensen met CDV is nog nooit aangetoond.

Het virus is enzoötisch (in het milieu) aanwezig. In de Nederlandse hondenpopulatie speelt CDV geen rol meer vanwege de beschikbaarheid van een effectief vaccin. Om die redenen adviseert de COGEM CDV te classificeren als een klasse 2 dierpathogeen. Gebaseerd op deze indeling kan zij instemmen met de door aanvrager voorgestelde inschaling van de *in vitro* werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II. Gezien het aërogene karakter van het virus vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. Daarnaast adviseert de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding verplicht.

Voor de *in vivo* werkzaamheden kan de COGEM instemmen met het door aanvrager voorgestelde inperkingsniveau DM-III onder de aanvullende voorwaarde dat de dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Op genoemde inperkingsniveaus en onder navolging van de aanvullende voorschriften 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

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

# Classificatie van *Canine distemper virus*

## COGEM advies CGM/100616-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de classificatie van het *Canine distemper virus* (CDV) en de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) CDV vectoren. De aanvrager, het Erasmus Universitair Medisch Centrum, vraagt een wijziging van vergunning IG 01-287/12 met de titel "Onderzoek aan mazelenvirus". Het wijzigingsverzoek betreft het toevoegen van werkzaamheden met een drietal gg CDV stammen aan de bestaande vergunning. De aanvrager wil met de betreffende rCDV's onderzoeken of het CDV als modelsysteem voor onderzoek naar het mazelenvirus kan dienen. Tevens hoopt de aanvrager een antwoord te vinden op de vraag of CDV na eventuele eradicatie van het mazelenvirus mogelijk een gevaar kan vormen voor mensen.

### Morbillivirus

Het CDV behoort tot de familie *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*. Tot dit genus behoren ook het *Rinderpestvirus*, het *Peste-des-Petits-Ruminants virus* en het voor mensen zeer infectieuze mazelenvirus. Morbillivirus-infecties veroorzaken wereldwijd significante mortaliteit in mensen en dieren.<sup>1</sup>

Het *Rinderpestvirus* en het *Peste-des-Petits-Ruminants virus* veroorzaken hoge mortaliteit in onder andere runderen, buffels, varkens, schapen en geiten. Het mazelenvirus 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>

Het natuurlijke gastheerbereik van CDV omvat leden van de orde *Carnivora*, waaronder honden, vossen, fretten, dassen, stinkdieren en leeuwen.

### *Canine distemper virus* genoom

CDV wordt omgeven door een lipidemembraan en heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom. Het genoom codeert voor verschillende eiwitten, waaronder de zogenaamde glycoproteïnes H (hemagglutinin) en F (fusion), het nucleocapside eiwit N, het polymerase eiwit L en het phospho-eiwit P. De glycoproteïnes H en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheer cel. Het nucleocapside eiwit vormt een beschermende laag om het RNA genoom en het polymerase- en phospho eiwit zijn verantwoordelijk voor transcriptie en replicatie van het genoom.<sup>3</sup>

### Kenmerken van *Canine distemper virus*

CDV veroorzaakt ziekte in zowel wilde als gedomesticeerde dieren van de orde *Carnivora*. Er zijn tevens aanwijzingen dat CDV primaten kan infecteren.<sup>4</sup> Een infectie van mensen met CDV is nog nooit aangetoond. Tussen CDV en het mazelenvirus bestaat immunologische kruisreactiviteit.

Deze kruisreactiviteit houdt in dat neutraliserende antistoffen en T-cel responsen die middels vaccinatie worden opgewekt tegen het mazelenvirus ook actief zijn tegen het CDV. Dit gegeven wordt geïllustreerd door het feit dat het levend verzwakte mazelenvaccin kan worden gebruikt tegen CDV infectie in honden.<sup>5,6</sup> In Nederland worden alle honden gevaccineerd tegen CDV, waardoor deze ziekte relatief zeldzaam geworden is.

Natuurlijke transmissie van CDV vindt plaats door zowel direct contact tussen dieren als via aëroge verspreiding. Vectoren spelen geen rol in de verspreiding van het virus. Infectie met CDV veroorzaakt bij honden de zogenoemde ‘hondenziekte’ of ziekte van Carré. De incubatietijd van deze ziekte kan variëren van 1 tot 4 weken en is afhankelijk van de virusstam, de leeftijd van het dier ten tijde van de infectie en de immunestatus van de gastheer. Infectie met CDV kan in het beginstadium tot verschillende klinische verschijnselen leiden, waaronder koorts, lusteloosheid, verminderde eetlust, uitdroging en gewichtsverlies. In een later stadium kan de ziekte zich op verschillende manieren ontwikkelen. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de zogenoemde acute systemische manifestatie (ook wel catarrale ziekte genoemd) en de chronisch nerveuze manifestatie.<sup>7</sup>

De acute systemische manifestatie is te herkennen aan ziekteverschijnselen als neus- en oogvloeijing, bindvliesontsteking, spijsverterings- en ademhalingsproblemen (waaronder braken, diarree, bronchitis en/of longontsteking). Tijdens de chronisch nerveuze manifestatie wordt ook het centrale zenuwstelsel (CZS) aangetast. Aantasting van het CZS kan gepaard gaan met gedragsstoornissen, motorische stoornissen, verlammingen en tics. In veel gevallen is het ziekteverloop zeer ongunstig en zal de hond sterven aan de infectie of hier blijvende schade aan overhouden.<sup>7</sup>

### **Kenmerken van het GGO**

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van een drietal gg-CDV stammen. Deze stammen bevatten allen het markergen voor Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP). Bij twee stammen is het EGFP gen als separate transcriptie-unit tussen de H- en L genen geplaatst, zonder deze genen te verstoren. De virulentie van deze virussen lijkt vergelijkbaar met die van de ouderstammen.<sup>8,9</sup> In het derde virus is het EGFP gefuseerd met het virale polymerase eiwit L, waarbij een deel van het polymerase eiwit vervangen is door EGFP. Dit heeft geleid tot attenuatie van het virus. Door fusie van EGFP aan het virale polymerase eiwit L werkt het RNA afhankelijke RNA polymerase complex minder efficiënt, waardoor de replicatie van het virus wordt vertraagd. In de wetenschappelijke literatuur staat beschreven dat de vertraagde replicatie het vermogen van het virus zich snel door de gastheer te verspreiden beïnvloedt. Hierdoor krijgt het immuunsysteem de kans om een effectieve afweerrespons tegen het virus op touw te zetten.<sup>10</sup>

### **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. 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.<sup>11</sup> 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 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 vaccinatie-middel, 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 enzoïtisch 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 persistentie;
- De mortaliteit kan hoog zijn;
- Er is geen effectief vaccin beschikbaar of preventieve vaccinatie vindt in de praktijk niet plaats.

Het CDV wordt op de Belgian Biosafety Server ingedeeld in dierpathogeniteitsklasse 3.<sup>12</sup> Door de Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) en de ATCC wordt CDV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2.<sup>13,14</sup>

#### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-CDV. Wel heeft de COGEM in 2006 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>11</sup>

#### **Overweging en advies**

##### ***Classificatie van Canine distemper virus***

CDV veroorzaakt ziekte in leden van de orde *Carnivora*. Tevens zijn er aanwijzingen dat CDV primaten kan infecteren.<sup>4</sup> Een infectie van mensen met CDV is nog nooit aangetoond. Op grond hiervan is de COGEM van mening dat CDV een dierpathogeen is en geen humaan pathogeen.

De aanvrager wil voor de werkzaamheden gebruik maken van een drietal gg-CDV stammen. Bij twee van de stammen lijkt de virulentie vergelijkbaar met die van de ouder stammen.<sup>8,9</sup> Het derde virus is geattenuëerd doordat het insert de efficiëntie van het polymerase complex beïnvloedt en daarmee de replicatie van het virus vertraagd.

Dierpathogene virussen worden op basis van het dierpathogene karakter en de milieurisico's ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen voor GGO-activiteiten. De COGEM is van mening dat de

eigenschappen van het virus overeen komen met criteria van zowel een klasse 2 als klasse 3 pathogeen. CDV heeft een groot gastheerbereik en kan na infectie in ongevaccineerde gastheersoorten hoge mortaliteit veroorzaken. Tevens is verspreiding van het virus mogelijk door direct contact en aëroge transmissie. Echter, het virus is enzoëtisch aanwezig, waardoor de consequenties van eventuele ontsnapping naar het milieu gering zijn. Daarnaast kunnen vatbare gezelschapsdieren met behulp van een effectief vaccin beschermd worden tegen een CDV infectie. In de Nederlandse hondenpopulatie speelt CDV dan ook geen rol meer. Gezien de grote gevoeligheid van de fret voor CDV en het feit dat het dier, eenmaal besmet, zal sterven, raad Stichting de Fret aan iedere fret preventief tegen CDV te vaccineren. De grootschalige vaccinatie in Nederland is een effectieve barrière tegen verspreiding van het virus.

Op basis van het enzoëtisch aanwezig zijn van het virus, het feit dat vectoren geen rol spelen in verspreiding van het virus en het feit dat er een effectief vaccin voorhanden is, acht de COGEM de classificatie van CDV als een klasse 2 dierpathogeen gerechtvaardigd. Dezelfde classificatie is van toepassing op de beschreven gg-CDV stammen gezien het feit dat twee van deze virussen een vergelijkbare virulentie lijken te hebben met de ouderstammen en het derde virus geattenuëerd is.

#### ***Inschaling van werkzaamheden met gg-CDV***

CDV kent een aëroge verspreidingswijze en verspreidt zich via zogenoemde ‘fomites’ zoals handen, voeten, deurknoppen, instrumentaria en gecontamineerde werkoppervlakten waarop het virus enkele uren kan overleven. Aangezien dierpathogene virussen niet pathogeen zijn voor de mens, zijn de inperkingsmaatregelen primair gericht op het voorkomen van ontsnapping uit een laboratorium en niet op de bescherming van laboratoriummedewerkers of anderen binnen het inperkingsgebied.

Gebaseerd op de indeling van CDV in pathogeniteitsklasse 2 en de afwezigheid van risico's voor de mens bij werkzaamheden met CDV kan de COGEM instemmen met de door aanvrager voorgestelde inschaling van de *in vitro* werkzaamheden met de drie gg-CDV stammen op inperkingsniveau ML-II. Gezien het aëroge karakter van het virus en het feit dat het zich via fomites kan verspreiden, vindt de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. Daarnaast adviseert de COGEM het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding verplicht.

Voor de *in vivo* werkzaamheden met de drie gg-CDV stammen kan de COGEM instemmen met het door aanvrager voorgestelde inperkingsniveau DM III. Gezien het aëroge karakter acht de COGEM het noodzakelijk dat de dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

De COGEM is van mening dat op bovengenoemd inperkingsniveau en door het hanteren van de gegeven aanvullende voorschriften de risico's van voorgenomen handelingen met de drie beschreven gg-CDV stammen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Lamb RA & Kolakofsky D (2001). *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
2. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/) (14-06-10)
3. Barret T (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Mic* 69: 3-13
4. Yoshikawa *et al.* (1989). Natural infection with Canine Distemper Virus in a Japanese Monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Mic* 20:193-205
5. Örvell C & Norrby E (1980). Immunological Relationships Between Homologous Structural Polypeptides of Measles and Canine. *J. gen.Virol* 50: 231-245
6. Norrby E & Appel MJ (1980). Humoral Immunity to Canine Distemper After Immunization of Dogs with Inactivated and Live Measles Virus. *Arch.Virol* 66: 169-177
7. Beineke *et al.* (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *J. Vet. Imm* 127:1-18
8. Rudd *et al* (2010). Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J. Gen. Virol* 91: 980-989
9. Confer *et al.* (1975). Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. *Infect Immun* 11: 835-44
10. Silin *et al* (2007). Development of a Challenge-Protective Vaccine Concept by Modification of the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase of Canine Distemper Virus. *J. Virol* 81: 13649-13654
11. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen - criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
12. 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)) (14-06-10)
13. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2009). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten.
14. ATCC: The Global Bioresource Center. [www.atcc.org](http://www.atcc.org) (14-06-10)