

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

DATUM 15 augustus 2023
KENMERK CGM/230815-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie rat cytomegalovirus (*Muromegalovirus muridbeta2*)

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een verzoek van het Academisch Ziekenhuis Leiden (LUMC) om de pathogeniteitsklasse van het rat cytomegalovirus te bepalen (IG 23-125_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het rat cytomegalovirus (RCMV, officiële soortnaam: *Muromegalovirus muridbeta2*). Tevens is de COGEM gevraagd of dit virus strikt dierpathogeen is.

RCMV is geïsoleerd uit de speekselklieren van wilde ratten. In gezonde dieren verloopt infectie vaak zonder symptomen. Het virus kan lange tijd latent aanwezig blijven, voornamelijk in de speekselklieren. Wanneer het immuunsysteem van de gastheer onderdrukt wordt, kan ernstige ziekte en sterfte optreden. Het RCMV heeft daarmee een vergelijkbaar ziekteverloop als het humane CMV (HCMV). Het wordt daardoor veel onderzocht als diermodel voor het ziekteverloop van HCMV. Cytomegalovirussen hebben in het algemeen een beperkt gastheerbereik. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen aanwijzingen dat RCMV mensen kan infecteren en ziekte bij mensen kan veroorzaken.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het RCMV (*Muromegalovirus muridbeta2*) strikt dierpathogeen is, ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 2 en geplaatst kan worden op Bijlage 4, lijst 4.1 van de Regeling ggo.



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 zijn de COGEM leden dr. M.C.W. Felkamp en prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie van het rat cytomegalovirus (*Muromegalovirus muridbeta2*)

COGEM advies CGM/230815-01

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van een verzoek van het Academisch Ziekenhuis Leiden (LUMC, IG 23-125) gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het *Muromegalovirus muridbeta2* (MuBHV2; voorheen Murid herpesvirus 2, ook wel bekend als rat cytomegalovirus, RCMV) voor plaatsing van dit virus op lijst 4.1 van Bijlage 4 van de ‘Regeling genetisch gemodificeerde organismen’ (Regeling ggo).¹ Hierbij is tevens gevraagd of deze virussen als strikt-dierpathogeen of als dier- en humaan pathogeen beschouwd dienen te worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (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.

2.1 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.² 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.³ 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.

3. Rat cytomegalovirus

Het rat cytomegalovirus (RCMV), tegenwoordig bekend als *Muromegalovirus muridbeta2* (MuBHV2, voorheen Murid betaherpesvirus 2, Murid herpesvirus 2) behoort tot het genus *Muromegalovirus*, subfamilie *Betaherpesvirinae* en de familie *Orthoherpesviridae*.⁴ Verondersteld wordt dat bij orthoherpesvirussen co-evolutie heeft plaatsgevonden met hun gastheer, waardoor met name virussen uit de subfamilies Beta- en Gammaherpesvirinae zeer gastheerspecifiek zijn.⁶ Na infectie kunnen orthoherpesvirussen levenslang latent aanwezig blijven, waarbij de virale genexpressie wordt geminimaliseerd. Ernstige ziekte treedt voornamelijk op in de foetus, of op heel jonge leeftijd, maar ook immuungecompromitteerde, of alternatieve gastheren kunnen ziek worden na infectie.⁶

RCMV bevat een lineair dubbelstrengs DNA genoom (dsDNA) van ongeveer 230 kpb⁵ en is omgeven door een eiwitmantel (capside). Om het capsid heen bevindt zich het tegument, ofwel de virale matrix, dat weer omgeven is door de virale envelop.⁶ Het genoom bevat minstens 167 eiwit-coderende open leesramen (ORFs), waarvan er 113 sterke gelijkenissen vertonen met die van muizen cytomegalovirus (MCMV) en 76 met die van humane CMV (HCMV).^{5,7} ORF 116 codeert voor een envelop glycoproteïne (R116 voor RCMV en UL116 voor HCMV) dat een rol speelt bij de infectie van gastheercellen.⁸

De eerste rapportage van een cytomegalovirus geïsoleerd uit een rat (de zwarte rat, *Rattus rattus*) betreft een studie uit 1969.⁹ Daaropvolgend zijn in 1982 enkele studies geweest waarbij het virus geïsoleerd is uit de speekselklieren van (wilde) bruine ratten (*Rattus norvegicus*) in Nederland (Maastricht-stam)¹⁰ en in Engeland.¹¹ Op basis van sequentie- en eiwitanalyses van het ‘major immediate early’ (MIE) locus, genoomgrootte en groeikarakteristieken werd later verondersteld dat het RCMV geïsoleerd in Engeland een andere CMV soort betreft.¹² Dit isolaat is vervolgens door de ‘International Committee on Taxonomy of Viruses’ (ICTV) geïsoleerd als nieuwe soort *Muromegalovirus muridbeta8* (voorheen Murid herpesvirus 8).¹³

RCMV (*Muromegalovirus muridbeta2*) veroorzaakt in rattencelculturen (rat embryofibroblasten) een cytopathisch effect, waarbij vergrote cellen worden waargenomen die typerend zijn voor infectie door cytomegalovirussen. In cellijnen afkomstig van muizen of mensen wordt geen cytopathisch effect waargenomen.¹⁰ Ook (immuungecompromitteerde) muizen blijken niet geïnfecteerd te kunnen worden met RCMV.¹⁴ Na infectie van gezonde laboratoriumratten met RCMV treedt een milde systemische infectie op, waarbij geen klinische symptomen worden waargenomen, zowel in lage als hoge doseringen en bij verschillende toedieningsroutes.¹⁵ De speekselklieren van ratten zijn de primaire infectieplaats waar efficiënte virusreproductie plaatsvindt. Tijdens de eerste paar weken na infectie wordt het virus in lage hoeveelheden uitgescheiden in urine, en is het in hoge hoeveelheden aanwezig in speeksel. Alleen in de speekselklieren wordt tot vier maanden na toediening nog in grote hoeveelheden infectieus virus aangetoond.^{15,16,17} Infectie van immuungecompromitteerde ratten (i.e. blootgesteld aan een hoge dosering bestraling) met 10^4 plaquevormende eenheden (PFU) RCMV veroorzaakte ziektesymptomen en hoge mortaliteit. Tien dagen na infectie was 90% van de dieren overleden.¹⁸

Betaherpesvirussen zoals RCMV kunnen in hematopoëtische cellen latent aanwezig blijven.⁶ De voornaamste manier waarop cytomegalovirussen overgedragen worden, is door contact met lichaamsvloeistoffen (met name speeksel en urine) of bloed (waaronder transplantatie). Van HCMV is bekend dat het de placenta kan infecteren en schade aan de ongeboren vrucht toe kan brengen. Van één CMV-isolaat uit de placenta en baarmoeder van een zwarte rat (*Rattus rattus diardii*) in Maleisië, bekend als ALL-03, is beschreven dat het virus via de placenta overgedragen kan worden aan de embryo (verticale transmissie).¹⁹ Deze stam lijkt echter op basis van restrictie-enzymanalyses te verschillen van de RCMV-isolaten uit Engeland en Maastricht.^{20,21} Uit onderzoek met de RCMV-Maastrichtstam bleek peritoneale inoculatie van zwangere ratten te resulteren in misvormingen tijdens de embryonale ontwikkeling en een hoger percentage doodgeboorte (31% versus 3% in de controle groep).²²

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder uit hetzelfde genus (*Muromegalovirus*) het MCMV (huidige soortnaam *Muromegalovirus muridbeta1*, voorheen Murid (beta)herpesvirus 1) als strikt-dierpathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{23,24}

5. Pathogeniteitsclassificaties door andere beoordelende instanties

In de ‘Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe’ (TRBA) van de ‘Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin’ (BAUA), die zich voor de risicobeoordeling richt op veiligheid voor medewerkers, is RCMV ingedeeld in risicogroep 1. Hierbij wordt opgemerkt dat vanwege de

pathogeniteit voor gewervelde dieren aanvullende veiligheidsmaatregelen nodig zijn (vergelijkbaar met de maatregelen die gehanteerd worden op inperkingsniveau 2) om het risico op verspreiding te minimaliseren.²⁵ In de classificatielijst van de Zwitserse ‘Bundesamt für Umwelt’ (BAFU) is het RCMV opgenomen in risicogroep 2, met de vermelding dat het virus alleen pathogeen is voor zoogdieren, en dat er geen gevallen van ziekte bij de mens zijn gerapporteerd.²⁶ De Belgische biologische veiligheidsinstantie ‘Belgian Biosafety Server’ heeft RCMV ingedeeld in risicogroep 2 als dierpathogeen.²⁷ De Canadese ‘Public Health Agency’ heeft RCMV als humaan pathogeen in risicogroep 1 ingedeeld, en als dierpathogeen in risicogroep 2.²⁸ De ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) heeft werkzaamheden met RCMV ingeschaald op BSL-2.²⁹ De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

6. Overweging en advies

RCMV is geïsoleerd uit ratten en heeft een vergelijkbaar ziekteverloop als het humane CMV, waarbij infectie van gezonde personen of dieren asymptomatisch verloopt, maar onderdrukking van het immuunsysteem tot ernstige ziekte of sterfte kan leiden. CMVs hebben in het algemeen een beperkt gastheerbereik. Vanwege deze gastheerspecificiteit wordt onderzoek gedaan met MCMV in muizen en RCMV in ratten om meer inzicht te krijgen in de pathogenese van HCMV. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen aanwijzingen dat RCMV mensen kan infecteren en ziekte bij mensen kan veroorzaken. Op basis van bovenstaande overwegingen beschouwt de COGEM RCMV als een strikt dierpathogeen virus. Aangezien RCMV bij ratten in het algemeen niet tot ernstige ziekte leidt, adviseert de COGEM om *Muromegalovirus muridbeta2* (MuBHV2; RCMV) in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en toe te voegen aan lijst 4.1 van Bijlage 4 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-04-01> (bezoekt op 1 augustus 2023)
2. COGEM (2014) Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
3. COGEM (2014) Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy browser, 2022 Release. <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt: 1 augustus 2023)
5. Vink C *et al.* (2000). Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 74: 7656-7665
6. Gatherer D *et al.* (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J. Gen. Virol.* 102: 001673
7. Brocchieri L *et al.* (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *J. Virol.* 79: 7570-7596
8. Gatault P *et al.* (2021). Rat and human cytomegalovirus ORF116 encodes a virion envelope glycoprotein required for infectivity. *Virology* 557: 23-33

9. Rabson AS *et al.* (1969). Isolation and growth of rat cytomegalovirus *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131: 923-927
10. Bruggeman CA *et al.* (1982). Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. Arch. Virol. 73: 231-241
11. Priscott PK & Tyrrell (1982). The isolation and partial characterisation of a cytomegalovirus from the brown rat, *Rattus norvegicus*. Arch. Virol. 73: 145-160
12. Beisser PS *et al.* (1998). The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains. Virology 246: 341-351
13. Ettinger J *et al.* (2012). Complete genome sequence of the English isolate of rat cytomegalovirus (Murid herpesvirus 8). J. Virol. 86: 13838
14. Sandford GR *et al.* (2001). Rat cytomegalovirus major immediate-early enhancer switching results in altered growth characteristics. J. Virol. 75: 5076-5083
15. Bruggeman CA *et al.* (1985). Biology of rat cytomegalovirus infection. Intervirology 24: 1-9
16. Kloover JS *et al.* (2000). Rat cytomegalovirus replication in the salivary glands is exclusively confined to striated duct cells. Virchows arch. 437: 41-421
17. Kloover JS *et al.* (2002). Persistent rat cytomegalovirus (RCMV) infection of the salivary glands contributes to the anti-RCMV humoral immune response. Virus Res. 85: 163-172
18. Stals FS *et al.* (1990). An animal model for therapeutic intervention studies of CMV infection in the immunocompromised host. Arch. Virol. 114: 91-107
19. Loh HS *et al.* (2006). Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. Virol. J. 3: 42
20. Loh HS *et al.* (2003). Characterization of a novel rat cytomegalovirus (RCMV) infecting placenta-uterus of *Rattus rattus diardii*. Arch. Virol. 148: 2353-2367
21. Balakrishnan KN *et al.* (2017). Identification and comparison of RCMV ALL 03 open reading frame (ORF) among several different strains of cytomegalovirus worldwide. Infect. Genet. Evol. 54: 81-90
22. Sun X *et al.* (2012). Effects of rat cytomegalovirus on the nervous system of the early rat embryo. Virologica sinica 27: 234-240
23. COGEM (2015). Pathogeniteitsclassificatie Murid herpesvirus 1, Cyprinid herpesvirus 3 en Spring viraemia of carp virus. COGEM advise CGM/151014-01
24. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA-virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
25. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA, 2012). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html> (bezoekt op 1 augustus 2023)
26. Federal Office of the Environment (FOEN, 2013). <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezoekt op 1 augustus 2023)
27. Belgian Biosafety Server (2008). <https://www.biosafety.be/content/tools-belgian-classification-micro-organisms-based-their-biological-risks> (bezoekt op 2 augustus 2023)
28. Public Health Agency of Canada. ePATHogen - Risk Group Database. <https://health.canada.ca/en/epathogen> (bezoekt op 2 augustus 2023)

29. American Type Culture Collection. Microbe products. Rat cytomegalovirus.
<https://www.atcc.org/products/vr-991> (bezocht: 1 augustus 2023)