

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 28 maart 2007
KENMERK CGM/070328-01
ONDERWERP Advies aanvullende voorschriften bij handelingen met gg-influenza A virussen
(IG 96-177-14)

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een wijzigingsverzoek op een vergunning van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de aard en noodzaak van aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen. Ten eerste zijn aan de COGEM aanvullende vragen voorgelegd over eerder uitgebrachte adviezen. Recent heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over onder andere aanvullende voorschriften bij handelingen met laagpathogene recombinant influenza A virussen. De COGEM is van mening dat dit advies ook van toepassing is op werkzaamheden met laagpathogene gg-influenza A virussen zonder inserties. Dit betekent bijvoorbeeld dat vaccinatie van de medewerker alleen noodzakelijk is als een mond- of neuskapje niet gedragen wordt.

Ten tweede is de COGEM gevraagd te adviseren over een wijzigingsverzoek op een vergunning. De werkzaamheden hebben betrekking op handelingen met proefdieren in associatie met de gg-virussen A/WSN/OVA_I en A/WSN/OVA_{II} (H1N1). De COGEM is van mening dat deze gg-virussen niet hoger pathogeen zijn dan het uitgangsvirus A/WSN/33. Werkzaamheden kunnen daarom plaatsvinden onder ML-II, danwel DM-II inperkingsniveau, met inachtneming van de aanvullende voorschriften zoals beschreven in het generieke influenza advies.

Met inachtneming van de gestelde voorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein voor de beschreven handelingen.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Aanvullende voorschriften bij handelingen met genetisch gemodificeerde influenza A virussen

COGEM advies CGM/070328-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen. De vragen betreffen enerzijds een wijzigingsverzoek op een vergunning. Anderzijds worden een aantal vragen gesteld over eerder uitgebrachte adviezen. Hierbij kunnen drie categorieën worden onderscheiden:

- A. Vragen met betrekking tot het generieke COGEM advies ‘Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen’ (CGM/061214-01).
- B. Vragen met betrekking tot het wijzigingsverzoek.
- C. Vragen met betrekking tot het COGEM advies ‘Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van ‘reverse genetics’ systeem’ (CGM/060724-03). Dit betrof werkzaamheden met het H3N2 influenza A virus A/Port Chalmers/1/73 (PC1).

Hieronder wordt op de afzonderlijke onderdelen ingegaan.

A. Vragen met betrekking tot het generieke influenza advies

In december jl. heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de te hanteren aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenza A virussen. Daarin is gesteld dat laboratoriumwerkzaamheden met virussen bestaande uit minimaal zes gensegmenten van het virus A/PR/8/34 of A/WSN/33 (beide H1N1) en maximaal twee gensegmenten van andere influenzavirussen onder inperkingsniveau ML-II kunnen worden uitgevoerd. De kans dat de introductie van maximaal twee gensegmenten een veranderde transmissie, pathogeniteit of fitness in vergelijking met de oorspronkelijke stammen zal opleveren, is namelijk als minimaal aan te merken. Hierbij heeft de COGEM gesteld dat het hemagglutinine gen geen polybasische klievingsplaats mag bevatten.

Destijds zijn de volgende aanvullende maatregelen opgesteld:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.
- Medewerkers met griepsymptomen worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden. Zij zijn namelijk drager van wildtype influenzavirussen. Na een

eventuele besmetting met gg-virus, zou uitwisseling van gensegmenten tussen de virussen kunnen optreden, met mogelijk een pathogeen virus tot gevolg.

- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje te dragen óf gevaccineerd te zijn tegen influenzavirussen waarvan verwacht wordt dat ze zullen circuleren in het betreffende seizoen.

Het ministerie van VROM bij monde van het Bureau GGO vraagt de COGEM nu welke inperkingsmaatregelen en aanvullende voorschriften noodzakelijk zijn voor werkzaamheden met de virusstammen A/PR/8/34 en A/WSN/33, welke gegenereerd zijn middels 'reverse genetics' zonder dat daar heterologe gensegmenten aan zijn toegevoegd óf sequentieveranderingen ten opzichte van de ouderstammen zijn geïntroduceerd. Er is in dit geval dus sprake van gg-virussen die identiek zijn aan de uitgangsvirussen. Aangezien onverwachte effecten als gevolg van de genetische modificatie uitgesloten kunnen worden, is de COGEM van mening dat werkzaamheden met deze virussen onder inperkingsniveau ML-II uitgevoerd kunnen worden.

De COGEM is verder van mening dat, vanuit pragmatische overwegingen, de aanvullende voorschriften voor handelingen met recombinante influenza A virussen op gelijke wijze toegepast moeten worden, ondanks dat deze voorschriften mogelijk aan de voorzichtige kant zijn. Werkzaamheden met gg-virussen zonder heterologe gensegmenten zullen in bijna alle gevallen gepaard gaan met handelingen met gg-virussen waaraan wel heterologe gensegmenten zijn toegevoegd. Vanuit praktisch handhavingsoogpunt is het onwenselijk om voor verschillende laagpathogene influenza virussen verschillende maatregelen voor te schrijven. Te meer omdat in een laboratorium vaak werkzaamheden met verschillende influenza A virussen gelijktijdig worden uitgevoerd. Gezien deze overwegingen acht de COGEM de aanvullende voorschriften uit het generieke advies ook van toepassing op handelingen met de bovengenoemde virussen.

Handelingen met proefdieren in associatie met de genoemde genetisch gemodificeerde stammen A/PR/8/34 en A/WSN/33, kunnen naar de mening van de COGEM plaatsvinden onder DM-II niveau gezien de laagpathogene aard van de virussen. De volgende voorschriften dienen hierbij gehanteerd te worden:

- Dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.
- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.

- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf gevaccineerd te zijn tegen influenzavirussen waarvan verwacht wordt dat ze zullen circuleren in het betreffende seizoen.

Overigens wijst de COGEM er op, daar er mogelijk verwarring is gerezen, dat in het generieke influenza advies alleen geadviseerd wordt over de te hanteren aanvullende voorschriften voor laboratoriumwerkzaamheden onder inperkingsniveau ML-II en ML-III. Het generieke advies gaat niet in op voorschriften omtrent handelingen met gg-influenza A virus in proefdieren.

B. Vragen met betrekking tot het wijzigingsverzoek

Dit onderdeel heeft betrekking op een adviesvraag naar aanleiding van een wijzigingsverzoek op een vergunning voor werkzaamheden met gg-influenza A virussen. In het onderzoek wordt getracht om de rol van immuunreceptoren in de bovenste luchtwegen van muizen te bestuderen na een infectie met influenza A virus. Hiertoe worden de virussen A/WSN/OVA_I (WSN-OVA_I) en A/WSN/OVA_{II} (WSN-OVA_{II}), welke gebaseerd zijn op de sterk verzwakte virusstam A/WSN/33, gegenereerd middels 'reverse genetics'. In het virale neuraminidase gen is een deelsequentie van het ovalbumine (OVA) kippenpeptide ingebracht. Hierdoor kunnen deze virussen het OVA peptide als epitoom tot expressie brengen op cellen.

Transgene of knock-out muizen worden met één van beide virussen geïnfecteerd via intranasale injectie, al dan niet in combinatie met transplantatie van T-cellen. Deze cellen zijn belangrijk voor het immuunsysteem en zijn afkomstig van een muis welke transgeen is voor de T-cel receptor specifiek voor de toegediende influenzastam. Uiteindelijk worden verschillende parameters gemeten om het verloop van de infectie in kaart te brengen.

De aanvrager geeft aan dat infectie van de proefdieren plaatsvindt in een veiligheidskabinet klasse-II onder DM-II niveau. De dieren worden onder hetzelfde inperkingsniveau gehuisvest in individueel beluchte filtertopkooien. Weefsels of cellen afkomstig van de dieren worden gehanteerd in een veiligheidskabinet klasse-II onder ML-II niveau.

In het verleden heeft de COGEM reeds verschillende malen gemeld dat influenzavirustype A/WSN/33 op grond van literatuurgegevens, avirulent en sterk geattenuëerd is voor mensen (1;2;3). Uit de literatuur blijkt verder dat het toevoegen van maximaal 28 aminozuren aan het neuraminidase eiwit de virulentie van dit virus niet significant verhoogt (4). Daarnaast blijkt het virus verzwakt in muizen wanneer een deel van het neuraminidase molecuul vervangen wordt door een niet gerelateerde

aminozuursequentie (5). In de gehanteerde virussen WSN-OVA_I en WSN-OVA_{II} zijn aminozuursequenties verwijderd uit het neuraminidase eiwit en vervangen door respectievelijk 8 en 17 aminozuren coderend voor het OVA-peptide.

De COGEM is derhalve van mening dat de gehanteerde virussen niet hoger pathogeen zijn dan het uitgangsvirus. Daarom acht zij de inschaling onder DM-II, dan wel ML-II, gerechtvaardigd. Daarnaast acht de COGEM de aanvullende voorschriften die gesteld zijn in het generieke COGEM influenza advies ook van toepassing op de bovengenoemde laboratoriumwerkzaamheden. Dit betekent dat de volgende aanvullende voorschriften van toepassing zijn op handelingen in de ML-II ruimte:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II.
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf gevaccineerd te zijn tegen influenzavirussen waarvan verwacht wordt dat ze zullen circuleren in het betreffende seizoen.

Handelingen met proefdieren in associatie met WSN-OVA_I en WSN-OVA_{II}, kunnen naar de mening van de COGEM plaatsvinden onder DM-II niveau. De voorschriften die gehanteerd dienen te worden onder dit niveau zijn:

- Dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.
- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf gevaccineerd te zijn tegen influenzavirussen waarvan verwacht wordt dat ze zullen circuleren in het betreffende seizoen.

C. Vragen met betrekking tot het advies over het PC1 virus

In juli vorig jaar heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met de door middel van 'reverse genetics' gegenereerde A/Port Chalmers/1/73 influenza virusstam (PC1; H3N2) (6). Het virusgenoom was niet gewijzigd; de werkzaamheden dienden slechts om ervaring te verkrijgen met 'reverse genetics'. Het fenotype van het gegenereerde virus werd tevens bestudeerd in dieren.

De COGEM heeft destijds vastgesteld dat het gehanteerde PC1 virus laagpathogeen is. Daarom heeft zij geadviseerd om de werkzaamheden onder ML-II, dan wel DM-II, uit te voeren met inachtneming van aanvullende voorschriften, waaronder het vaccineren van medewerkers.

In het latere generieke advies heeft de COGEM haar eerdere adviezen en alle relevante informatie betreffende laagpathogene influenza A virussen en aanvullende voorschriften geëvalueerd. De commissie kwam tot de conclusie dat vaccinatie bij werkzaamheden met de verzwakte stammen A/PR/8/34 of A/WSN/33 slechts noodzakelijk is wanneer geen mond- of neuskapje gedragen wordt. Aan de COGEM is nu gevraagd of zij vaccinatie nog noodzakelijk acht bij de beschreven werkzaamheden met het gegenereerde PC1 virus. De COGEM is van mening dat de aanvullende voorschriften uit het generieke advies ook op de hierboven beschreven werkzaamheden met het PC1 virus van toepassing zijn, aangezien dit virus laagpathogeen is. Vaccinatie is daarmee alleen noodzakelijk als een mond- en neuskapje niet gedragen wordt.

Ten slotte vraagt Bureau GGO of vaccinatie van de medewerker dient ter bescherming van de medewerker zelf of ter voorkomen van verspreiding van gg-virussen in het milieu in geval van werkzaamheden met verzwakte influenzastammen. De COGEM wijst op het belang om medewerkers te vaccineren tegen influenzavirussen waarvan verwacht wordt dat ze zullen circuleren in het betreffende seizoen. Zodoende wordt namelijk voorkomen dat een medewerker drager is van wildtype influenzavirussen. Indien een medewerker geïnfecteerd is met een wildtype virus en daarnaast besmet raakt met gg-virus bestaat de kans op uitwisseling van gensegmenten tussen de virussen. Een dergelijke reassortment kan mogelijk leiden tot een hoogpathogeen virus, welke zich vervolgens zou kunnen verspreiden onder de bevolking. Aangezien dit onwenselijk is, zijn alle door de COGEM voorgestelde maatregelen er daarom uiteindelijk op gericht om de kans op de vorming en verspreiding van reassortments in het milieu te beperken.

Referenties

1. COGEM (2005). Pathogeniteitsstudies met recombinante Influenza A virussen (CGM/050201-01).
2. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen (CGM/061214-01).
3. World Health Organization (WHO) (2005). WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. Internet: <http://www.who.int/biologicals/publications/ECBS%202005%-20Annex%205%20Influenza.pdf> (23 maart 2007).

4. Castrucci, M.R. en Kawaoka, Y. (1993). Biologic importance of neuraminidase stalk length in Influenza A virus. *J. Virol.* **67**(2):759-764.
5. Castrucci, M.R., Bilsel, P. en Kawaoka, Y. (1992). Attenuation of influenza A virus by insertion of a foreign epitope into the neuraminidase. *J. Virol.* **66**(8): 4647-4653.
6. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem (CGM/060724-03).