

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

DATUM 10 mei 2007
KENMERK CGM/070510-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van de werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus door Nobilon International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met het influenza A virus A/Leningrad/134/17/57 (Len17; H2N2). Twee gensegmenten van dit virus zullen vervangen worden door segmenten van een H5N1 virus. De aanvrager is voornemens om dit genetisch gemodificeerd (gg-) virus te gebruiken voor de ontwikkeling van een levend verzwakt H5N1 influenzavaccin en wil de efficiëntie ervan bestuderen ten opzichte van een geïnactiveerd influenzavaccin. Hij is van mening dat de handelingen kunnen worden uitgevoerd onder ML-II en DM-III inperkingsniveau.

Naar de mening van de COGEM is het gg-virus sterk verzwakt, hetgeen onder meer is gebleken nadat vaccins gebaseerd op Len17 aan miljoenen mensen zijn toegediend. Zij is daarom van mening dat laboratoriumhandelingen met het gg-virus kunnen plaatsvinden onder ML-II niveau, zoals reeds eerder is geadviseerd voor twee andere laagpathogene influenza A virussen. Om eventuele risico's, zoals direct contact van de medewerker met het gg-virus, verder te minimaliseren dienen aanvullende voorschriften in acht genomen te worden.

Verder zal het gg-virus worden toegediend aan dieren onder DM-III niveau. Na toediening kunnen de dieren het virus uitscheiden via de ademhalingswegen. Indien medewerkers besmet raken en daarnaast tevens drager zijn van een wildtype influenzavirus, zou mogelijk uitwisseling van gensegmenten tussen beide virussen kunnen optreden. Dit zou eventueel kunnen leiden tot een hoogpathogeen virus. Besmetting van de medewerkers dient daarom voorkomen te worden. Een veiligheidskabinet klasse-II of isolator ontbreekt echter. Daarom dragen medewerkers onder meer ademhalingsbescherming tijdens de werkzaamheden. Echter, precieze gegevens over het masker, de hoeveelheid uitgescheiden virus en de mate van luchtverversing in de DM-III ruimte, ontbreken. Dit maakt dat de COGEM geen uitspraak kan doen over de mate van bescherming van de medewerker tijdens het uitvoeren van werkzaamheden met dieren en dat zij niet kan instemmen met voorgestelde inschaling. Zij stelt daarom voor om de aanvrager uit te nodigen om gegevens aan te leveren, zodat bepaald kan worden of de ademhalingsbescherming de medewerker voldoende bescherming biedt tegen contact met het gg-virus.

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

Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus

COGEM advies CGM/070510-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met een genetisch gemodificeerd (gg-) influenza A virus. De aanvrager geeft aan dat het een verzwakt virus betreft dat niet langer pathogeen is. Hij is voornemens om dit virus te gebruiken voor de ontwikkeling van een levend verzwakt H5N1 influenzavaccin en wil de efficiëntie ervan bestuderen ten opzichte van een geïnactiveerd influenzavaccin. Hij is van mening dat de handelingen met het genetisch gemodificeerd organisme (ggo) kunnen worden uitgevoerd onder ML-II en DM-III inperkingsniveau.

Influenza A virussen

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus en wordt van persoon tot persoon overgedragen door hoesten of niezen. Het is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, Influenza A, B en C (1;2). Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). De HA en NA eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (3).

Classificatie van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus* 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor, terwijl bij de mens voor zover bekend H1, H2, H3, N1 en N2 voorkomen. Inmiddels blijkt dat ook H5, H7 en H9 bij de mens tot infecties kunnen leiden (4;5).

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een recombinant influenzavirus waarvan zes gensegmenten afkomstig zijn van de stam A/Leningrad/134/17/57 (Len17; H2N2) en twee segmenten (HA en NA) van het H5N1 virus A/Indonesië/5/05 (Len17/H5N1). Het HA segment mist de basische klievingsplaats. Aanwezigheid van deze plaats is een belangrijke aanwijzing voor de pathogeniteit van het virus.

De aanvrager stelt dat virussen op basis van A/Leningrad/134/17/57 verzwakt zijn door de aanwezigheid van mutaties in gensegmenten coderend voor interne eiwitten van het virus. Dergelijke virussen hebben het fenotype 'cold adapted', 'temperature sensitive'

en 'attenuated' (ca/ts/att). Dit fenotype is tot stand gekomen door het oudervirus A/Leningrad/134/57 (Len57) tijdens kweek in kippeneieren 17 maal te passeren, steeds bij lagere temperaturen. Dit heeft ertoe geleid dat het virus zich heeft aangepast aan vermenigvuldiging bij 25°C ('cold adapted'). Het virus repliceert daarentegen slecht bij temperaturen van 39-40°C ('temperature sensitive') (6). In geval van een infectie betekent dit dat het virus efficiënt repliceert in de bovenste luchtwegen, waar de temperatuur laag is, terwijl vermenigvuldiging in de warmere onderste luchtwegen wordt tegengegaan. Indien hier namelijk wel een hoge mate van replicatie zou optreden, doet dit de kans op complicaties toenemen (6). De mutaties die leiden tot het betreffende fenotype blijken stabiel aanwezig te zijn (7).

De aanvrager geeft aan dat Len17 al meer dan dertig jaar gebruikt wordt als basis voor levend verzwakte influenzavaccins in Rusland en andere landen van de voormalige Sovjet Unie. Al meer dan 100 miljoen mensen zijn inmiddels gevaccineerd met dergelijke virussen.

Eerder COGEM advies

In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van influenza A virussen (CGM/040326-03). De COGEM heeft destijds geadviseerd om voor ggo activiteiten alle influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3, aangezien influenza A virussen in staat zijn om zich op een relatief eenvoudige manier aan te passen tot hoogpathogene stammen én omdat deze virussen een potentieel gezondheidsrisico voor mens en dier zijn. Deze indeling houdt onder andere in dat ggo activiteiten met het virus minimaal ingeschaald worden op ML-III of DM-III niveau, waarbij afhankelijk van het type werkzaamheden aanvullende eisen gesteld kunnen worden, zoals adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen (8).

De COGEM heeft verder over een aanvraag geadviseerd, waarbij tijdens laboratoriumwerkzaamheden onder andere recombinante virussen geproduceerd werden op basis van de geattenueerde influenzavirustype A/Puerto Rico/8/34 en A/WSN/33 (beide H1N1) (9). Het betrof de vervaardiging van recombinante virussen bestaande uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen. De aanvrager heeft destijds aangegeven dat het HA gen geen basische klievingsplaats bevat. Bovendien zijn er in de heterologe genoomsegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht. De COGEM heeft geadviseerd dat de productie van de recombinante influenza A virussen, de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en de handelingen met cellen en

weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden aangezien het sterk verzwakte virussen betrof (9).

Afgelopen jaar heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de te hanteren aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met verzwakte genetisch gemodificeerde influenza A virussen op onder meer ML-II niveau (10). De COGEM heeft geadviseerd dat bij werkzaamheden plaatsvindend onder ML-II niveau de volgende aanvullende voorschriften van toepassing zijn:

- 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

Adviesvraag

De aanvrager is voornemens om handelingen met Len17 uit te voeren in cellen en proefdieren (fretten). De vervaardiging van het virus maakt geen deel uit van de vergunningaanvraag. De aanvrager ontvangt het gg-virus van het Amerikaanse Centers for Disease Control (CDC). Alvorens het virus toe te sturen, test het CDC of dit het juiste fenotype bezit en daarmee verzwakt is.

Om de efficiëntie van het toekomstige vaccin te testen, zal het gg-virus in eerste instantie door de aanvrager worden opgekweekt in eukaryotische cellen. Vervolgens wordt het fenotype (ca/ts/att) van het virus bevestigd door een genotypische en fenotypische analyse. Het genotypisch onderzoek houdt in dat een sequentieanalyse zal plaatsvinden. Het bepalen van het fenotype zal zowel *in vitro* (in eukaryotische cellen en kippeneieren) als *in vivo* (in fretten) worden uitgevoerd. Het onderzoek in proefdieren zal plaatsvinden door het virus via de neus toe te dienen, waarna de aanwezigheid van het virus in de bovenste en onderste luchtwegen geanalyseerd wordt.

De aanvrager geeft aan dat na toediening van het virus aan fretten, dit normaal gesproken een aantal dagen aantoonbaar aanwezig is in materiaal afkomstig uit de neus van fretten. Hij is echter van mening dat de hoeveelheid uitgescheiden virus in de ruimte erg laag zal zijn.

De aanvrager geeft aan de beschreven werkzaamheden te willen uitvoeren onder ML-II en DM-III niveau. In de ML-II ruimte zullen open handelingen plaatsvinden in een veiligheidskabinet type II. De dierverblijven beschikken niet over een veiligheidskabinet

of een autoclaaf, maar de ruimte is wel geschikt bevonden als DM-III. Om risico's op verspreiding van ggo's te beperken, gelden een aantal werk- en inrichtingsvoorschriften.

Het ontbreken van een autoclaaf wordt opgelost door het biologische afval en ander besmet materiaal op te slaan in eenmalig te sluiten, breukvaste, lekdichte containers. Deze vaten worden in de DM-III ruimte gedesinfecteerd, waarna ze verbrand worden.

Verder hanteert de aanvrager in de dierverblijven een omkleedprocedure. Bij het betreden van de dierverblijven (via een sluis) wisselen de medewerkers hun kleding. Dit houdt in dat zij zich volledig uitkleden in de eerste voorruimte, vervolgens onder een douche doorlopen, waarna zij in de tweede voorruimte werkkleding aantrekken en adembescherming opdoen. De werkkleding bestaat uit wegwerpondergoed, overall, laarzen en handschoenen. De adembescherming bestaat uit een helm waarop een filterunit is aangesloten die de ingaande lucht filtert via een HEPA filter.

Wanneer medewerkers de ruimte verlaten, blijft de helm en de werkkleding in de tweede voorruimte. Vervolgens wordt gedoucht en wordt de eigen kleding weer aangetrokken.

De dierverblijven worden op onderdruk gehouden en zijn voorzien van HEPA filters die de in- en uitgaande lucht filteren.

Overweging en advies

Zoals eerder beschreven, kunnen handelingen met genetisch gemodificeerde influenza A virussen onder inperkingsniveau ML-II plaatsvinden als de virussen laagpathogeen zijn. De aanvrager maakt gebruik van een ggo op basis van Len17 met het fenotype ca/ts/att. Momenteel wordt veel onderzoek gedaan, waaronder door de Verenigde Staten, naar het gebruik van levend verzwakte influenza A virussen als vaccins. In Rusland loopt dergelijk onderzoek al sinds de zestiger jaren (11). Dit land maakt met name gebruik van vaccins op basis van Len17. Uit de literatuur blijkt dat deze vaccins door Rusland al aan miljoenen mensen tussen 3 en 65 jaar zijn toegediend (6). Er zijn geen aanwijzingen dat dit tot grote gevolgen voor de gezondheid heeft geleid en naar de mening van de COGEM heeft de vaccinatie zelfs geen of weinig negatieve gevolgen gehad (12).

Verder blijkt uit onderzoek in fretten, welke een adequaat diermodel vormen om de verzwakte aard van een influenzavirus te bestuderen, dat Len17 6-8 dagen na toediening een zeer lichte ontsteking van het neusslijmvlies veroorzaakt (13). Daarentegen veroorzaakt de ouderstam Len57 de gehele observatieperiode (8 dagen) symptomen die vergelijkbaar zijn met een bovenste luchtweginfectie, dit wil zeggen een ernstige ontsteking van het neusslijmvlies, niezen, slaperigheid en gebrek aan eetlust (13). De onderzoekers concluderen hieruit dat Len17 dusdanig verzwakt is dat dit geschikt is voor gebruik in levende vaccins (13).

Recent is ook een onderzoek uitgevoerd waarbij Len17 het H5 gensegment van het influenza A virus A/Duck/Potsdam/1402-6/86 bevat. Dit recombinante virus bleek verzwakt te zijn in muizen en was niet-infectieus in kippen (14)

Gezien bovenstaande overwegingen, is de COGEM van mening dat Len17 een sterk verzwakt virus is. De COGEM adviseert daarom dat ggo activiteiten in een laboratorium kunnen plaatsvinden onder ML-II inperkingsniveau, in lijn met haar eerdere voorstel voor de laagpathogene influenza A stammen A/PR/8/34 en A/WSN/33 (9). Hierbij merkt de COGEM op dat het CDC voor levering aan Nobilon Len17/H5N1 test op het juiste fenotype en daarmee de mate van attenuering bepaalt. Indien bij het CDC blijkt dat het ggo niet over het juiste fenotype beschikt, adviseert de COGEM om handelingen met het ggo op een hoger niveau dan ML-II uit te voeren. Het is dan namelijk mogelijk dat het virus minder verzwakt is.

Wanneer Len17/H5N1 over het juiste fenotype beschikt, kunnen de werkzaamheden onder ML-II plaatsvinden. Om eventuele risico's verder te beperken, adviseert de COGEM om aanvullende voorschriften te hanteren conform het eerdere generieke advies (15). Het betreft hier:

- 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
- De backbone van het te vervaardigen gg-virus bestaat uit minimaal 6 gensegmenten die afkomstig zijn uit A/Leningrad/134/17/57
- Heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd
- Voor heterologe HA-coderende gensegmenten geldt dat de aanwezigheid van een basische klievingsplaats is uitgesloten.

Voor werkzaamheden met kippeneieren heeft de COGEM in 2005 reeds geadviseerd om de volgende aanvullende voorschriften te hanteren (9):

- Geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed
- De dozen worden uitsluitend geopend in een veiligheidskabinet klasse-II. Bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Naast laboratoriumwerkzaamheden, wil de aanvrager handelingen met dieren geassocieerd met Len17/H5N1 uitvoeren in een DM-III ruimte. Na nasale toediening van

het virus, zou dit mogelijkwijs via de ademhalingswegen uitgescheiden kunnen worden. Het recombinante virus kan zich via kleine deeltjes verspreiden door de lucht in de ruimte. Een andere mogelijke verspreidingsbron is via stofdeeltjes van besmette mest van de proefdieren. Verspreiding zou voorkomen moeten worden om de veiligheid van medewerkers en het milieu te waarborgen. Indien medewerkers besmet raken en tevens zelf drager zijn van een wildtype virus, of wanneer zij het virus verspreiden naar naasten in hun omgeving die drager zijn, dan zou uitwisseling van gensegmenten tussen beide virussen eventueel kunnen leiden tot het ontstaan van een hoogpathogeen virus. Dit zou mogelijk verspreid kunnen worden in het milieu.

Medewerkers in de onderhavige DM-III ruimte kunnen blootgesteld worden aan het uitgescheiden ggo, omdat de ruimte niet beschikt over een veiligheidskabinet klasse-II (voor het uitvoeren van open handelingen), daarnaast worden de dieren niet in isolatoren dan wel filtertopkooien gehouden. Om medewerkers toch maximaal te beschermen tegen blootstelling aan het ggo, wordt een omkleedprocedure gehanteerd. De COGEM is van mening dat deze procedure adequaat is. Tevens geeft de aanvrager aan dat medewerkers adembescherming moeten dragen in de vorm van een helm met een filterunit (HEPA filter). Bureau GGO geeft aan dat deze bescherming vergelijkbaar is met een volledig gezichtbeschermend persluchtmasker. Omdat precieze gegevens over het masker, de hoeveelheid vrijkomend virus en de mate van luchtverversing in de DM-III ruimte ontbreken, is de COGEM van mening dat het inschatten van de mate van blootstelling van de medewerkers niet mogelijk is. Zij stelt daarom voor om de aanvrager uit te nodigen om deze gegevens aan te leveren, zodat bepaald kan worden of de ademhalingsbescherming de medewerker voldoende bescherming biedt tegen direct contact met het ggo.

Referenties

1. Knipe, M. D. en Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
2. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego.
3. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 54: 196-209.
4. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., en Skalka, A. M. (2004). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, Washington, D.C.
5. Lewis, D. B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-54.
6. Palker, T., Kiseleva, I. et al. (2004). Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants. *Virus Res*. 105: 183-194.
7. Youil, R., Kiseleva, I. et al. (2004). Phenotypic and genetic analyses of the heterogeneous

- population present in the cold-adapted master donor strain: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virus Res.* 102: 165-176.
8. COGEM (2004). *Inschaling van Influenza A virusstammen (CGM/040326-03)*
 9. COGEM (2005). *Pathogeniteitstudies met recombinant Influenza A virussen (CGM/050201-01).*
 10. COGEM (2006). *Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenzavirussen (CGM/061214-01).*
 11. Kendal, A. Maassab, H.F. et al. (1981). Development of cold-adapted recombinant live, attenuated influenza A vaccines in the U.S.A. and U.S.S.R. *Antiviral Res.* 1: 339-365.
 12. Khan, A.S., Polezhaev, F. et al. (1996). Comparison of US inactivated split-virus and russian live attenuated, cold-adapted trivalent vaccines in Russian schoolchildren. *J. Infect. Dis.* 173: 453-456.
 13. Marsh, G.A., Watson, J.M. et al. (2003). An evaluation of the genetic stability and pathogenicity of the Russian cold-adapted influenza A donor strains A/Leningrad/134/17/57 and A/Leningrad/134/47/57 in ferrets. *J. Virol. Methods* 107:63-69.
 14. Desheva, J.A., Lu, X.H. et al. (2006). Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. *Vaccine* 24: 6859-6866.
 15. COGEM (2007). *Aanvullende voorschriften bij handelingen met genetisch gemodificeerde influenza A virussen (C/GM/070328-01)*