

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

**DATUM** 15 mei 2007  
**KENMERK** CGM/070515-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling van studie: pathogenese en transmissie van influenzavirussen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag, getiteld 'Pathogenese en transmissie van (hoog pathogene aviaire) influenza virussen' van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, en het voorstel tot inschaling dat door het Bureau GGO is opgesteld, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) influenza A virussen. De te produceren virussen worden samengesteld uit delen van hoog- en laagpathogene influenza A stammen afkomstig uit alle mogelijke gastheren. Het doel van het onderzoek betreft het bepalen van de genetische veranderingen die van invloed zijn op pathogeniteit en transmissie van deze virussen. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om al de experimenten met (hoog pathogene aviaire) gg-influenza A virus te mogen uitvoeren op DM-III niveau met onderdruk, waarbij gebruik wordt gemaakt van een veiligheidskabinet klasse-III.

De COGEM is van mening dat laboratoriumwerkzaamheden met hoogpathogene influenza A virussen uitgevoerd dienen te worden op ML-III inperkingsniveau, maar vindt dat dergelijke werkzaamheden desgewenst ook kunnen worden uitgevoerd op DM-III niveau met onderdruk. Door het gebruik van een veiligheidskabinet klasse-III in plaats van het minimaal vereiste veiligheidskabinet klasse-II ziet zij bovendien geen toegevoegde waarde van mond-, neus- en oogbeschermende middelen. Verder is de COGEM van mening dat proefdierexperimenten uitgevoerd dienen te worden op DM-III niveau in een onderdrukisolator. Onder de gestelde voorwaarden vindt de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van beschreven experimenten 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, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

# **Titel: Pathogenese en transmissie van influenzavirussen**

## **COGEM advies CGM/070515-01**

### **Inleiding**

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende onderzoeksactiviteiten met (hoog pathogene aviaire) genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen, waarvoor dezelfde aanvrager reeds een vergunning heeft. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om al de experimenten met recombinant influenza A virussen, die zijn ingeschaald op ML-III niveau te mogen uitvoeren op DM-III niveau met onderdruk. In deze DM-III faciliteiten zullen alle open handelingen worden verricht in een veiligheidskabinet van een hogere veiligheidsklasse (klasse-III) dan eerder geadviseerd (klasse-II) (12). Het doel van het beschreven onderzoek is uit te zoeken welke (combinatie van) genen en mutaties de pathogene eigenschappen en transmissie van influenza A virussen bepalen.

### **Influenza A virussen**

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als griepvirus, behoort tot de familie van *Orthomyxoviridea* en wordt onderverdeeld in drie typen, te weten Influenza A, B en C (1,2). 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 vindt plaats op basis van de vóórkomende HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor influenza A virus zestien verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en negen verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9).

Door mutaties en het uitwisselen van genoomsegmenten tussen influenzavirussen kunnen laagpathogene influenzavirussen evolueren tot hoogpathogene virussen. Dit proces heeft in het verleden al diverse hoogpathogene influenzavirussen doen ontstaan die verschillende pandemieën hebben veroorzaakt, zoals de Spaanse griep in 1918, de Aziatische griep in 1957 (subtype H2N2) en de Hongkong griep in 1968 (subtype H3N2) (4,5). Bovendien heeft het hoogpathogene influenzavirus type H5N1 in Azië verscheidene slachtoffers geëist bij uitbraken in 1997 en 2005 en heeft het influenza subtype H7N7 in Nederland en België een uitbraak van de vogelgriep veroorzaakt in 2003 (6,7,8). Belangrijk is hierbij aan te tekenen dat tijdens de Aziatische uitbraken het influenzavirus direct van vogels op mensen werd overgedragen en mogelijk ook direct van mens op mens (4,5).

### **Eerder COGEM advies**

Gezien de eenvoudige wijze waarop influenza A virussen tot hoogpathogene stammen transformeren en het feit dat influenza A virussen een potentieel gezondheidsrisico inhouden voor mens en dier, heeft de COGEM reeds in 2004 geadviseerd activiteiten met genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3 (9).

Sindsdien heeft de COGEM verschillende malen geadviseerd over werkzaamheden met gg-influenza A virussen en heeft zij gesteld dat alle handelingen met deze virussen minimaal ingeschaald dienen te worden op ML-III of DM-III niveau. Als uitzondering op deze regel heeft de COGEM geoordeeld dat de laboratoriumwerkzaamheden met virussen bestaande uit minimaal zes of zeven gensegmenten van de A/PR/8/34 of A/SWN/33 stam en een of twee gensegmenten van andere influenzavirussen onder inperkingsniveau ML-II uitgevoerd kunnen worden. Hierbij is onder andere als voorwaarde gesteld dat het hemagglutinine gen geen polybasische klievingsplaats mag bevatten, aangezien deze klievingsplaats een belangrijke determinant blijkt te zijn voor de pathogeniteit van virussen van subtypen H5 en H7 (10).

Om de risico's tijdens laboratoriumwerkzaamheden met gg-influenza A virussen op ML-III inperkingsniveau verder te beperken, heeft de COGEM tevens een aantal aanvullende voorschriften geadviseerd (11, 12):

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden
- Het dragen van handschoenen is verplicht
- Bij werkzaamheden met H7 gg-influenzavirussen is een beschermende bril verplicht
- Het dragen van een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) is verplicht.

Voor de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met gg-influenza A virussen is door de COGEM voorgesteld aan bovengenoemde voorschriften twee voorschriften toe te voegen, te weten (11):

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

Voor werkzaamheden met proefdieren in combinatie met gg-influenza A virussen heeft de COGEM geadviseerd deze te verrichten op een DM-III inperkingsniveau met toevoeging van het voorschrift dat de dieren in onderdrukisolatoren dienen te worden gehuisvest (11).

### **Adviesvraag**

De aanvrager wil bestuderen welke (combinaties van) genen en mutaties de pathogene eigenschappen en transmissie-efficiëntie van influenza A virussen beïnvloeden. Om dit te onderzoeken worden in het laboratorium *reassortants* vervaardigd die in 1957 tot het pandemische H2N2 virus hebben geleid en in 1968 tot het pandemische H3N2 virus. De biologische eigenschappen van dergelijke “experimentele pandemische virussen” zullen worden vergeleken met die van de “echte pandemische virussen” om te bepalen welke genetische veranderingen in aviaire influenzavirussen bijdragen aan het pandemisch potentieel van deze virussen. Tevens zal worden onderzocht welke veranderingen in H7N7 (HPAI) en H5N1 (HPAI) nodig zijn om deze te veranderen in virussen die tussen zoogdieren worden overgedragen en aanleiding kunnen zijn voor een nieuwe pandemie. Hiertoe worden gensegmenten van hoogpathogene influenzavirussen uitgewisseld met huidige humane influenza A virussen en worden verscheidene (combinaties van) mutaties aangebracht waarvan verwacht mag worden dat ze bijdragen aan de pathogenese en transmissie.

De aanvrager beoogt genoemde gg-influenzavirussen te maken door transfectie van acht verschillende gensegmenten van een negental oudervirussen, waarna *in vitro* selectie op basis van replicatie efficiëntie en receptor binding plaatsvindt. Virussen met pandemisch potentieel worden vervolgens getest op de overdraagbaarheid via aerosolen in fretten en waar nodig in andere proefdiermodellen.

De COGEM heeft eerder geadviseerd om laboratoriumwerkzaamheden met gg-influenza virussen uit te voeren op ML-III niveau met gebruik van veiligheidskabinet klasse-II. De aanvrager geeft echter aan de werkzaamheden uit te willen voeren in een nieuwe DM-III ruimte waarbinnen zowel de laboratoriumwerkzaamheden als ook de dierproeven in respectievelijk een HEPA-gefilterde veiligheidskabinet klasse-III en een HEPA gefilterde onderdrukisolator zullen plaatsvinden. Beide kunnen aan elkaar gekoppeld worden zodat alle open handelingen met influenza A virussen in een gesloten systeem zullen plaatsvinden.

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de beschreven studies. In het bijzonder is de COGEM gevraagd of de werkzaamheden uitgevoerd mogen worden in een DM-III ruimte met onderdruk, waarbij

alle open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet klasse-III en een aantal aanvullende voorschriften zullen gelden.

### **Overwegingen en advies**

De aanvrager geeft aan dat beoogde recombinante influenza A virussen die gebaseerd zijn op pandemische virussen van 1957 en 1968 geen groter pandemisch potentieel kunnen bezitten dan desbetreffende virussen uit 1957 en 1968 zelf, door een zekere mate van kruisbescherming die nog in de bevolking aanwezig is. Over de te vervaardigen zoogdieroverdraagbare H7N7 en H5N1 virussen is de aanvrager echter van mening dat het pandemisch potentieel mogelijk hoger is dan dat van de pandemische virussen uit 1918, 1957 en 1968. Gezien het pandemische potentieel van de te vervaardigen gg-influenzavirussen is de aanvrager voornemens alle werkzaamheden, waaronder vervaardiging en productie van gg-influenzavirus en de analyse van cellen en weefsels verkregen uit proefdierenexperimenten te verrichten in een veiligheidskabinet klasse-III geplaatst op DM-III inperkingsniveau. Tevens geeft de aanvrager aan proefdierexperimenten met gegenereerde virusvarianten uit te willen voeren in onderdrukisolatoren (met HEPA filters) op DM-III inperkingsniveau. Hierbij kunnen de onderdrukisolatoren via een poort aan het veiligheidskabinet klasse-III worden gekoppeld zodat virussen in een gesloten systeem van kabinet naar isolator kunnen worden doorgegeven en vice versa.

De COGEM is van mening dat het pandemische potentieel van te ontwikkelen recombinanten zowel afhangt van de virulentie van dergelijke gg-virussen alsook van de mate van kruisbescherming in de bevolking. Dit afwegende, deelt de COGEM de inschatting van de aanvrager in zake het mogelijk hoog pandemisch potentieel van de te ontwikkelen gg-influenzavirussen. De COGEM adviseert daarom dat gg-activiteiten met influenzavirussen minimaal uitgevoerd dienen te worden op inperkingsniveau ML-III/DM-III. Gezien het feit dat voorgeschreven inrichtingsvoorschriften voor een ML-III ruimte minimaal ook gelden voor een DM-III ruimte, ziet de COGEM geen extra risico's voor mens en milieu als alle handelingen met het virus en met het virus geassocieerde materiaal worden uitgevoerd in betreffende DM-III faciliteiten.

Zoals eerder door de COGEM aangegeven dient contact van medewerker met gg-influenza A virussen geminimaliseerd te worden (11, 12). Daarom heeft de COGEM geadviseerd handelingen met gg-influenza A virussen minimaal uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse-II en daarbij altijd handschoenen te dragen. Om de kans op besmettingen verder te reduceren en omdat het niet is uit te sluiten dat gg-influenza virus via aerosolen uit een veiligheidskabinet klasse-II in de laboratoriumruimte komt heeft de COGEM bovendien geadviseerd om een mond- en neuskapje (Europees CE

gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen. In het specifieke geval van werkzaamheden met H7 influenzavirussen komt daar het dragen van een bril bij, omdat dit subtype influenzavirussen ooginfecties kan veroorzaken. Aangezien de aanvrager van plan is een veiligheidskabinet klasse-III te gebruiken in plaats van een klasse-II kabinet en omdat dit type veiligheidskabinet een direct contact met gg-influenzavirus verhindert, acht de COGEM het in onderhavige aanvraag niet noodzakelijk bovenstaande aanvullende voorschriften te handhaven.

Gezien bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat beschreven handelingen met gg-influenzavirus verricht kunnen worden in een veiligheidskabinet klasse-III op DM-III inperkingsniveau met onderdruk. Om eventuele risico's verder te beperken, adviseert de COGEM tevens de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen influenza A virus
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.

Voor de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met gg-influenza A virussen vindt de COGEM dat aan bovenstaande voorschriften de volgende twee dienen te worden toegevoegd:

- De geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed
- De dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet klasse-III geopend en bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Voor werkzaamheden met proefdieren in combinatie met gg-influenza A virussen adviseert de COGEM de dieren in onderdrukisolatoren te huisvesten en dient de aanvrager maatregelen te treffen, zoals bv. kevlar handschoenen die voorkomen dat een bijtincident met betreffende proefdieren kan resulteren in het vrijkomen van virus uit het gesloten systeem.

De aanvrager geeft aan dat de autoclaaf buiten de DM-III ruimte is geplaatst. Hoewel de COGEM het wenselijk acht dat de autoclaaf binnen de DM-III ruimte wordt geplaatst, is zij van mening dat er feitelijk geen besmetting van de afvalvaten kan optreden als alle open handelingen met het gg-influenzavirus worden verricht in een fysiek gesloten systeem. Indien daar aan toe wordt gevoegd dat de buitenkant van de afvalvaten grondig worden gedesinfecteerd, brengt het aangegeven beperkte transport buiten de DM-III ruimte van desbetreffende afvalvaten volgens de COGEM geen extra risico's met zich mee voor mens en milieu.

## Conclusie

Conform eerdere adviezen is de COGEM van mening dat laboratoriumwerkzaamheden met gg-influenzavirussen in het algemeen uitgevoerd dienen te worden op ML-III inperkingsniveau met een aantal aanvullende voorschriften. Ten aanzien van onderhavige aanvraag is zij echter van mening dat het door de aanvrager voorgestelde DM-III inperkingsniveau met onderdruk, het gebruik van veiligheidskabinet klasse-III en de door bureau GGO gestelde voorschriften minstens zo veilig zijn als de door de COGEM opgestelde algemene richtlijnen. Indien men hier aan toevoegt dat alle open handelingen met gg-influenzavirus, inclusief de experimenten met dieren, in een gesloten system kunnen worden uitgevoerd, voorziet de COGEM geen extra risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van voorgestelde werkzaamheden. Met inachtneming van gestelde inperkingmaatregelen en aanvullende voorschriften, is de COGEM daarom van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## 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. Palese, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nat Med* 10, blz. S82-7
5. Lipatov, A. S., Govorkova, E. A., Webby, R. J., Ozaki, H., Peiris, M., Guan, Y., Poon, L., and Webster, R. G. (2004). Influenza: emergence and control. *J Virol* 78, blz. 8951-9
6. Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F., and Webster, R. G. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, blz. 472-7
7. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., and Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, blz. 1840-2
8. Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A., and Bosman, A. (2004). Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363, blz. 587-93
9. COGEM (2004). *Inschaling van Influenza A virusstammen (CGM/040326-03)*
10. 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>

11. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen (CGM/061214-01)
12. COGEM (2005). Pathogeniteitsstudies met recombinante Influenza A virussen (CGM/050201-01)