



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk
SAS/2004021012

Uw brief van
27 februari 2004

Kenmerk
CGM/040326-03

Datum
31 maart 2004

Onderwerp
Advies Influenza A virus

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag van 27 februari jl. betreffende 'het voornemen tot herziening van de inschaling van Influenza A virusstammen of van genetisch materiaal verkregen uit deze stammen, voor ingeperkt gebruik', adviseert de COGEM als volgt.


Samenvatting:

Griepvirussen (*Influenza virus*) worden momenteel ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, terwijl het vogelgriepvirus (subtype van *Influenza A virus*) zwaarder ingedeeld wordt. Hieruit volgt dat laboratoriumactiviteiten met genetisch gemodificeerde virussen op ML-II of ML-III niveau ingeschaald worden. De pathogeniteit van het vogelgriepvirus blijkt uit de recente uitbraken in Azië en het feit dat ook mensen met deze gevaarlijke virusvariant besmet kunnen raken. Het is niet ondenkbaar dat in een laboratorium door genetische modificatie vergelijkbare pathogene influenzavirussen kunnen ontstaan. De COGEM is gevraagd te adviseren over herziening van de inschaling van influenzavirussen, in het bijzonder Influenza A virusstammen, voor werkzaamheden binnen een laboratorium.

De COGEM is van mening dat alle influenza A virussen ingedeeld dienen te worden in pathogeniteitsklasse 3. Genetische modificatie activiteiten met deze virussen dienen op minimaal ML-III inperkingsniveau ingeschaald te worden. Hierbij kunnen aanvullende voorschriften gelden zoals adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen. De COGEM adviseert voorts een case-by-case beoordeling voor alle Influenza A virus aanvragen, waarbij op basis van de aard van de experimenten, keuze van virusstammen of virale sequenties, de inschaling verlaagd kan worden.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

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

Dit COGEM advies is mede tot stand gekomen dankzij de adviezen van de subcommissie Medisch Veterinair van de COGEM en in overleg met Dr. G. Koch, Centraal Instituut voor Dierziektecontrole in Lelystad.

Titel: Inschaling van Influenza A virusstammen

COGEM advies: CGM/040326-03

Inleiding

De COGEM is door het ministerie van VROM gevraagd te adviseren over herziening van de inschaling van influenzavirussen, gezien een aantal zoönotische incidenten rond influenza A virussen en de wetenschappelijke onzekerheid over de invloed van individuele griepvirusgenen of genoomsegmenten op de virulentie. Het ministerie van VROM heeft het voornemen om de systematiek die gevolgd wordt bij de inschaling van activiteiten met genetisch gemodificeerde Influenza A virussen als volgt te wijzigen. Bij de inschaling wordt primair uitgegaan van de pathogeniteitsklasse van de gebruikte virussen:

1. Aviaire influenza A virussen (AI) worden gerekend tot pathogeniteitsklasse 3 in plaats van pathogeniteitsklasse 2D. Experimenten gericht op genetische modificatie van deze virussen worden ingeschaald op minimaal ML-III inperkingsniveau (6).
2. Niet-aviaire influenza A virusstammen worden in de toekomst ook gerekend tot pathogeniteitsklasse 3 in plaats van pathogeniteitsklasse 2 voor productie en toepassingen van genetisch gemodificeerde organismen (ggo). Projecten met deze virussen worden in principe ingeschaald op minimaal ML-III inperkingsniveau (6). Hierbij wordt de nuancering aangebracht dat indien een aanvrager van mening is dat de specifieke activiteiten die hij wil uitvoeren lager kunnen worden ingeschaald, dit in de vergunningaanvraag met argumenten onderbouwd aangeven kan worden. Dit kunnen argumenten zijn over bijvoorbeeld de aard van de experimenten, keuze van virusstammen of van virale sequenties. Dergelijke aanvragen zullen case-by-case worden beoordeeld.

Influenza A virussen

Het influenzavirus wordt ook wel het griepvirus genoemd. Het veroorzaakt een acute infectie van de bovenste luchtwegen. De symptomen van een infectie zijn onder meer snel opkomende koorts, spierpijn, rillerig, vermoeidheid, keelpijn en hoesten. Eén tot drie dagen na infectie kunnen deze symptomen ontstaan. De symptomen kunnen ongeveer vijf dagen aanhouden. Tot die tijd is het virus nog infectieus. De gerelateerde vermoeidheid en uitgeblustheid kunnen echter nog dagen tot weken aanhouden. Voor bepaalde groepen, zoals hart- of longpatiënten, suikerpatiënten, patiënten met een onvoldoende functionerend afweersysteem of ouderen, kunnen influenzavirusinfecties en mogelijke vervolg infecties ernstige gevolgen hebben.

Tijdens een griepuitbraak (epidemie) krijgen gemiddeld 10% van de volwassenen en ongeveer 30% van de kinderen griep (4; 11).

Het influenzavirus behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en wordt onderverdeeld in drie typen, te weten Influenza A, B en C (11). Het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren, terwijl het *Influenza B* en *C virus* hoofdzakelijk mensen infecteren. Het *Influenza A virus* heeft een RNA genoom bestaande uit acht unieke segmenten. Het totale genoom codeert voor tien eiwitten, waaronder haemagglutinine, neuraminidase, matrixeiwitten M1 en M2, niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, en drie polymerasecomplexen (1; 11). Het genoom van het virus is omgeven door een kapsel bestaande uit matrixeiwitten met daarop haemagglutinine en neuraminidase eiwitten. Het haemagglutinine (HA) is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheercel, terwijl het neuraminidase (NA) een rol speelt bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (1; 12). In totaal zijn er 15 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H15) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend voor het *Influenza A virus* (1; 11). Bij vogels komen alle subtypen voor en bij de mens alleen H1, H2, H3, N1, N2, N7 en recentelijk ook H5, H7 en H9 (4). De virussen worden geclassificeerd op basis van de aanwezigheid van de verschillende haemagglutinine en neuraminidase subtypen.

Evolutie Influenza A virussen

Influenzavirussen kunnen relatief snel evolueren tot nieuwe virussen met andere eigenschappen en gastheerbereik als gevolg van ‘antigene drift’ en ‘antigene shift’ (1; 4; 13). Bij ‘antigene drift’ vinden er mutaties plaats in het RNA genoom van het virus, die vervolgens tot kleine veranderingen kunnen leiden op eiwitten waar antistoffen aan binden, zoals haemagglutinine en neuraminidase. Door de ophoping van verschillende mutaties zullen op een gegeven moment de beschermende antistoffen die zijn geïnduceerd door eerdere infecties, geen bescherming meer bieden tegen het veranderde virus. Bij een ‘antigene shift’ wordt het erfelijk materiaal van het ene influenzavirus vermengd met dat van een ander subtype virus. Dit kan alleen plaatsvinden indien beide virussen zich in dezelfde cel vinden. Gezien het feit dat een influenzavirus bestaat uit acht verschillende genoomsegmenten, kunnen er in dit geval 256 unieke combinaties gevormd worden (1). Hierdoor kan een pathogeen influenzavirus ontstaan met geheel nieuwe eigenschappen en oppervlakte eiwitten, waartegen in de populatie geen antistoffen aanwezig zijn. Vermenging van een niet-virulent humaan influenzavirus met een pathogeen aviaire influenzavirus kan leiden tot het ontstaan van een pathogeen humaan influenzavirus. Het proces van ‘antigene

drift' en 'antigene shift' heeft zich in het verleden vaker voorgedaan. Het subtype H1N1 was in 1918 de oorzaak van de 'Spaanse griep', in 1957 veroorzaakte het subtype H2N2 de 'Aziatische griep' en in 1968 was het subtype H3N2 de oorzaak van de 'HongKong griep'.

Aviaire influenza

Aviaire influenza oftewel vogelgriep of vogelpest wordt veroorzaakt door een *Influenza A virus*. Wilde vogels vormen primair de bron van alle subtypen van Influenza A virussen (2). Verondersteld wordt dat het merendeel van de influenza A virussen die worden gevonden bij andere dieren, zoals varkens en paarden, of bij de mens, oorspronkelijk van aviaire herkomst zijn (13). De meeste influenza A virussen veroorzaken bij vogels asymptomatische of milde infecties. Sommige stammen evolueren tot hoog pathogene aviaire influenzavirussen. Het virus is zeer besmettelijk voor kippen en kalkoenen, maar ook parelhoenders, eenden, ganzen, kwartels, duiven, fazanten, patrijzen en loopvogels (struisvogels) zijn vatbaar (11). Een uitbraak van pathogene aviaire influenza is voor het eerst beschreven in 1878 in Italië, waarbij een zeer besmettelijke virusstam een mortaliteit onder vogels bereikte van ongeveer 100%. Het virus wordt verspreid door intensief contact met besmet pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en via kleine deeltjes door de lucht. Buiten de gastheer blijft het virus bij lage temperaturen voor enkele maanden infectieus. Bij een watertemperatuur van 22°C kan het virus tot vier dagen infectieus blijven. Het virus kan vernietigd worden bij een temperatuur van 56°C of hoger, en met desinfectiemiddelen zoals formaline (14).

Recentelijk is duidelijk geworden dat mensen geïnfecteerd kunnen raken met pathogene aviaire influenzavirussen. Tijdens de vogelgriep in Hongkong van 1997 zijn mensen met het subtype H5N1 besmet geraakt. De mortaliteit onder de geïnfecteerde mensen was ongeveer 30% (3). In 2003 werden ook Nederland en België geteisterd door de vogelgriep. Hierbij veroorzaakte het subtype H7N7 bij een gedeelte van de blootgestelde mensen oogontsteking met in één geval een dodelijke afloop (7). Het vogelgriepvirus dat nu in Azië heerst is van het subtype H5N1. Alleen al in Thailand en Vietnam is de ziekte bij 34 patiënten waargenomen. Volgens de meest recente cijfers van de WHO van 17 maart jl. zijn hiervan 23 patiënten overleden (15). Volgens de 'World Health Organization' (WHO) worden mensen niet besmet door consumptie van vlees van gevogelte, maar wel door nauw contact met gevogelte dat door de vogelgriep is besmet.

Laboratoriumactiviteiten met aviaire influenza A virussen

Virulente aviaire influenzavirussen worden in de huidige Regeling GGO tot pathogeniteitsklasse 2D gerekend (9). Deze indeling leidt in veel gevallen tot inschaling van ggo activiteiten met deze stammen op minimaal ML-III niveau. Momenteel worden niet-aviaire stammen van het *Influenza A virus* gerekend tot pathogeniteitsklasse 2. Dit zou leiden tot inschaling van ggo activiteiten met deze stammen op minimaal ML-II niveau. Gezien de huidige kennis op het gebied van influenzavirussen en hedendaagse 'reverse genetics' methodologieën is het mogelijk dat door middel van genetische modificatie influenzastammen gevormd kunnen worden met een verhoogde pathogeniteit of virulentie (1; 8). De adviesvraag van het ministerie van VROM beperkt zich tot Influenza A virusstammen. Influenza B en C virusstammen worden ingedeeld bij pathogeniteitsklasse 2, waarbij ggo activiteiten met deze virussen ingeschaald worden op minimaal ML-II niveau.

Overwegingen

In de huidige regelgeving wordt onderscheid gemaakt tussen virulente aviaire influenzavirus stammen en overige influenzavirus stammen (9). Een aantal van de *Influenza A virus* subtypen komt ook bij mensen voor zoals H1, H2, H3, N1, N2 en N7. Met het uitbreken van de vogelgriep in Hongkong in 1997 en 1999 werd duidelijk dat ook mensen vatbaar waren voor het subtype H5N1 en H9N2 (3). Bij de uitbraak in Nederland en België in 2003 zijn mensen besmet geraakt met het subtype H7N7 (7). Hieruit blijkt dat mensen naast de genoemde subtypen ook geïnfecteerd kunnen raken met de subtypen H5, H7 en H9. Het *influenza A virus* dat nu in Azië heerst is van het subtype H5N1. Een groot aantal mensen zijn besmet geraakt en aan de ziekte overleden (15).

Gastheerspecificiteit

De gastheerspecificiteit van het virus wordt onder meer bepaald door het HA eiwit. In vogels bindt het HA eiwit aan sialic acid α 2,3-galactose, terwijl de receptor voor het *Influenza A virus* in mensen het sialic acid α 2,6-galactose is (10). Varkens bezitten beide typen receptoren en worden daarom als mengvat gezien voor potentiële pathogene influenzavirussen, hoewel deze theorie nog steeds omstreden is. Het verschil in herkenning van het HA eiwit voor de receptor is gelegen in slechts twee aminozuren van het HA eiwit. Een mutatie hierin kan ervoor zorgen dat een influenzavirus dat alleen vogels als gastheer heeft, nu ook in staat is om mensen te infecteren en vice versa (4). Met bovenstaande gegevens is het niet eenvoudig om onbetwist aan te geven of een bepaald subtype een aviair of humaan influenzavirus is.

De COGEM is derhalve van mening dat geen onderscheid meer moet worden gemaakt tussen humane en aviaire virussen in de indeling voor influenza A virussen.

Pathogeniteit

De virulentie of pathogeniteit van influenza A virussen wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten die bijdragen aan de virulentie zijn niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, en de polymerasecomplexen PB1 en PB2, en HA (5; 12). Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong avirulente virusstam virulent te maken (1; 4). Naast deze vier eiwitten is ook het neuraminidase (NA) betrokken bij de regulatie van de virulentie van het virus onder zowel *in vivo* als *in vitro* omstandigheden (4). Virulente stammen in mensen en varkens zijn doorgaans van het subtype N1 of N2, terwijl in paarden vaak de subtypen N7 en N8 hebbenvoorkomen.

Naast het gegeven dat de gastheerspecificiteit onder andere bepaald wordt door het HA eiwit, speelt dit eiwit ook een rol bij de pathogeniteit van het *Influenza A virus*. In een geïnfecteerde cel komt het HA gen van het virus tot expressie. Het gevormde HA eiwit heeft een specifieke knipplaats voor een cellulair protease. Doordat het HA eiwit geknipt wordt door het protease kunnen nieuwe virusdeeltjes in de cel gevormd en uitgescheiden worden. Het betreffende protease is voornamelijk actief in epitheelcellen van de luchtwegen, waardoor deze cellen vatbaar zijn voor het virus. Een verandering van enkele aminozuren in deze knipplaats zorgt ervoor dat ook andere proteases die actief zijn in andere cellen het HA eiwit kunnen knippen (4; 5). Hierdoor verandert de specificiteit en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit (1; 4). Uit de influenzavirus uitbraken in het verleden blijkt dat de hoogpathogene virusstammen voornamelijk van het subtype H5, H7 en H9 zijn (15). De virulentie van het virus kan als gevolg van slechts enkele mutaties drastisch veranderen. Tevens kunnen meerdere factoren de pathogeniteit van het virus beïnvloeden. Hierdoor is het volgens de COGEM moeilijk in te schatten wat de mate van virulentie van een bepaald subtype is. Dit is zeker het geval bij zogenaamde ‘reverse genetics’ experimenten waarbij het mogelijk is dat door middel van genetische modificatie influenzastammen gevormd kunnen worden met een veranderde pathogeniteit of virulentie (1; 8).

Vaccins

Aangezien influenzavirussen relatief snel kunnen evolueren als gevolg van ‘antigene drift’ en ‘antigene shift’, is het mogelijk dat in de natuur een pathogeen influenzavirus ontstaat (1; 4; 13). In de populatie kunnen tegen dit virus nog geen antistoffen aanwezig zijn en is er nog geen effectief vaccin voorhanden. Immers, jaarlijks worden nieuwe vaccins gemaakt tegen bepaalde subtypen van het influenzavirus die in de betreffende periode onder de bevolking kunnen voorkomen (2). Door de variatie van subtypen dient het vaccin ieder jaar bijgesteld te worden. Derhalve is de kans

aanwezig dat een pathogeen subtype ontstaat waartegen nog geen vaccin ontwikkeld is. Hierbij is van belang dat werkzaamheden met de subtypes H1, H2 en H3, die in humane vaccins voorkomen, op zich niet tot een verlaging van het risico voor mens en milieu leiden, omdat de variatie binnen een subtype zeer groot kan zijn, eventueel leidend tot het volledig ontbreken van bescherming door vaccinatie. Zo was het H7 subtype van de uitbraak in 2003 in Nederland volledig afwijkend van het H7 subtype dat gebruikt wordt in alle paardenvaccins. Met chemoprofylaxen, zoals amantadine en rimantadine, kan het virus wel bestreden worden, hoewel resistente mutanten bekend zijn. Andere profylaxische middelen zijn zanamivir en oseltamivir die effectief zijn tegen type A en B influenzavirussen (14; 17).

Advies

Samenvattend is de COGEM van mening om in de classificatie van influenza A virussen geen onderscheid meer te maken tussen aviaire en niet-aviaire virussen. Voor hoogpathogene aviaire influenzavirusstammen is gebleken dat deze tot nu toe behoren tot de H5 en H7 subtypen (15). Deze hoogpathogene stammen kunnen ontstaan uit laagpathogene stammen. Tevens is voor de H5 en H7 subtypen, en waarschijnlijk ook het H9 subtype, aangetoond dat directe transmissie naar de mens mogelijk is. Gezien het feit dat influenza A virussen in staat zijn om op een relatief eenvoudige manier te muteren tot hoogpathogene stammen én voor een potentieel gezondheidsrisico voor mens en dier zorgen, is de COGEM van mening dat alle influenza A virussen ingedeeld dienen te worden in pathogeniteitsklasse 3. Deze indeling houdt onder andere in dat ggo activiteiten 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 (6; 16). De COGEM is voorts van mening dat ggo activiteiten met influenza A virussen case-by-case beoordeeld dienen te worden, waarbij specifieke activiteiten op een lager inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden, mits de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd blijft. Aspecten die voor een lagere inperking kunnen pleiten zijn bijvoorbeeld de aard van de experimenten, de keuze van virusstammen of de te gebruiken virale sequenties.

Referenties

1. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, blz. 196-209
2. The Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Internet:

<http://www.cdc.gov/nip/ACIP/default.htm> (25-03-2004)

3. 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
4. Flint, S. J. (2004). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, D.C.
5. 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
6. Integrale versie van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2003).
7. 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
8. Ozaki, H., Govorkova, E. A., Li, C., Xiong, X., Webster, R. G., and Webby, R. J. (2004). Generation of high-yielding influenza A viruses in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *J Virol* **78**, blz. 1851-7
9. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
10. Rogers, G. N. and D'Souza, B. L. (1989). Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* **173**, blz. 317-22
11. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
12. Zambon, M. C. (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* **11**, blz. 227-41
13. Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S., and Webster, R. G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* **73**, blz. 8851-6
14. Avian Influenza, Office International des Epizooties (OIE). Internet: http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm (25-03-2004)
15. World Health Organization (WHO), Internet: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2004_03_17/en/ (25-03-2004)
16. Interim biosafety risk assessment – Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. World Health Organization, November 2003. Internet: http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/influenzaRMD2003_5.pdf (25-03-2004)

17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Internet: <http://www.cdc.gov/flu/avian/> (25-03-2004)