

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	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 04-048.co1	7 mei 2004	CGM/040518-02	21 mei 2004
Onderwerp			
Advies kennisgeving IG 04-048			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van kennisgeving IG 04-048, getiteld 'Aviaire Influenza: Onderzoek naar parameters belangrijk voor controlestrategieën', van het CIDC-Lelystad, en het voorblad en voorstel tot inschaling dat door het Bureau GGO is opgesteld, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante aviaire influenza A virussen. De virussen die geproduceerd worden in het laboratorium zijn samengesteld uit laag en hoog pathogene aviaire influenza A virussen. Het doel van het experiment is om te achterhalen welke delen van het virus verantwoordelijk zijn voor de virulentie van het virus. Daarnaast zal een diagnostische test ontwikkeld worden voor aviaire influenza. De COGEM heeft eerder geadviseerd om alle influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3 (CGM/040326-03).

De COGEM is van mening dat de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden uitgevoerd dienen te worden op ML-III inperkingsniveau conform de pathogeniteitsklasse 3 van het virus. Proefdierexperimenten met kippen, eenden en varkens dienen uitgevoerd te worden op DM-III niveau. Om het risico van verspreiding van het recombinante virus in te perken acht de COGEM aanvullende voorschriften, welke afwijkend zijn van het voorstel van Bureau GGO, noodzakelijk. Met inachtneming van de inperkingsmaatregelen en de in dit advies vermelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu 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, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a horizontal line underneath the name.

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

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

Titel: Recombinante virussen samengesteld met behulp van ‘reverse genetics’ uit hoog- en laag pathogene aviaire Influenza A virussen

COGEM advies: CGM/040518-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante aviaire influenza A virussen. Het doel van het project is om parameters te identificeren die betrokken zijn bij de pathogeniteit van het virus voor de ontwikkeling van controlestrategieën voor aviaire influenza A. Hiertoe worden met behulp van ‘reverse genetics’ recombinante virussen geproduceerd die samengesteld zijn uit hoog pathogene (HP) en laag pathogene (LP) aviaire influenza A stammen afkomstig van pluimveebedrijven en wilde fauna. Eenden en kippen zullen geïnfecteerd worden met de recombinante virussen, waarbij pathogeniteitstesten, vaccinatie/challenge proeven en transmissie- en tropismestudies uitgevoerd worden.

Aviaire influenza A virussen

Het influenzavirus wordt ook wel het griepvirus genoemd. Het behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en wordt onderverdeeld in drie typen, te weten Influenza A, B en C (12). 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; 12). Het genoom van het virus is omgeven door een kapsel bestaande uit matrix-eiwitten met daarop haemagglutinine en neuraminidase eiwitten. Het haemagglutinine (HA) is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheer cel, 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; 13). 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; 12).

Bij vogels komen alle subtypen voor en bij de mens alleen H1, H2, H3, N1, N2, N7 en recentelijk ook H5, H7 en H9 (3). De virussen worden geclassificeerd op basis van de aanwezigheid van de verschillende haemagglutinine en neuraminidase subtypen.

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 (15). 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 (14). 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 (12). 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, of met desinfectiemiddelen zoals formaline (16).

Adviesvraag

Mensen kunnen geïnfecteerd raken met pathogene aviaire influenzavirussen, ondermeer met de subtypen H5N1 en H7N7 (2; 7). Naast het feit dat besmetting vaak leidt tot oogontsteking bij mensen, is recent duidelijk geworden dat deze subtypen niet alleen dodelijk kunnen zijn voor vogels, maar ook voor mensen (17; 18).

Het doel van de experimenten is om parameters te identificeren van het aviaire influenza A virus die betrokken zijn bij de pathogeniteit van het virus. Daarnaast zal een diagnostische serologische test ontwikkeld worden voor aviaire influenza A. Hiertoe worden aviaire influenza A virus genen tot expressie gebracht in *E. coli* of in insectencellen met behulp van het baculo-expressiesysteem. Voor de pathogeniteitsstudies zal het genoom van hoog-pathogene en laag-pathogene varianten van het aviaire influenza A virus volledig wordt gesequenced. Vervolgens worden de acht genoomsegmenten van de verschillende virussen door middel van RT-PCR gekloneerd in plasmide vectoren. Met behulp van deze plasmiden zullen vervolgens weer virussen worden gegenereerd door middel van co-transfectie van alle genoomsegmenten in eukaryotische cellen. Dit proces staat bekend onder de naam 'reverse genetics' (5; 8-10). Door het uitwisselen van genoomsegmenten en/of specifieke sequenties kan achterhaald worden welke eiwitten en/of genoomsequenties betrokken zijn bij de pathogenese en verspreiding van het virus. De geproduceerde recombinante virussen worden gekarakteriseerd aan de hand van het H/N serotype en

hun virulentie voor kippen met behulp van een intraveneuze pathogeniteitsindex (IVPI) test. Tevens wordt de pathogeniteit bepaald door sequentie analyse van de proteolytische knipplaats van het HA eiwit. In eerste instantie zullen pathogeniteitstesten uitgevoerd worden met kippen en eenden. Te zijner tijd zal ook het varken als proefdier gebruikt worden. De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen pathogeniteitsstudies.

Eerder COGEM advies

Recentelijk heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van influenza A virussen (CGM/040326-03). De COGEM heeft geadviseerd om alle influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3, gezien het feit dat influenza A virussen in staat zijn om op een relatief eenvoudige manier te muteren tot hoogpathogene stammen én dat deze virussen voor een potentieel gezondheidsrisico voor mens en dier zorgen. 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). De COGEM heeft voorts geadviseerd (CGM/040326-03) dat ggo activiteiten met influenza A virussen van geval tot geval beoordeeld dienen te worden, waarbij specifieke activiteiten op een lager inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden, mits de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd blijft.

Overweging en advies

In de voorgenomen experimenten worden de verschillende genoomsegmenten van zowel hoog als laag pathogene aviaire influenzavirussen uitgewisseld. De virulentie of pathogeniteit van influenza A virussen wordt door een aantal factoren bepaald (11). De eiwitten die bijdragen aan de virulentie zijn niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, en de polymerasecomplexen PB1 en PB2, en HA (4; 13). Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong avirulente virusstam virulent te maken (1; 3). 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 (3).

Virulente stammen in mensen en varkens zijn doorgaans van het subtype N1 of N2, terwijl bij paarden alleen de subtypen N7 en N8 voorkomen. 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 virale HA gen tot expressie. Het gevormde HA eiwit heeft een specifieke

knipplaats voor een cellulair protease. Splitsing van het HA eiwit door het protease is noodzakelijk voor de vorming en uitscheiding van nieuwe virusdeeltjes. 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 basische aminozuren in deze knipplaats zorgt ervoor dat ook andere proteases die actief zijn in andere cellen het HA eiwit kunnen knippen (3; 4). Hierdoor verandert de specificiteit en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit (1; 3). Doordat de knipplaats van het HA eiwit van de recombinante aviaire influenza A virussen bepaald wordt, kan dit dienen als een aanwijzing voor de virulentie van het virus. Daarnaast zal de pathogeniteit van de recombinante virussen bepaald worden door middel van de IPVI-test in kippen. De IPVI-waarde is minimaal nul en maximaal drie. Bij waarden hoger dan 1,3 is er volgens de aanvrager sprake van een virulente stam. Tot nog toe is uit eerdere experimenten van de aanvrager gebleken dat in alle gevallen waarbij op grond van de IPVI-test sprake is van een virulent virus, de knipplaats van het HA eiwit bestaat uit meerdere basische aminozuren. Hierdoor kan het eiwit ook in veel meer verschillende cellen geknipt worden, waardoor het virus een veranderde pathogeniteit en gastheerbereik heeft (1; 3; 4).

Handelingen in laboratoria

De COGEM heeft eerder geadviseerd dat zowel de hoog als laag pathogene stammen van het aviaire *influenza A virus* beschouwd dienen te worden als pathogeniteitsklasse 3 virussen. Omdat recombinante virussen geproduceerd worden middels genomsegmenten afkomstig van hoog en laag pathogene aviaire influenza A virusstammen, is een reële kans aanwezig dat recombinante virussen geproduceerd worden met een hoge virulentie (1; 5; 8-10). Derhalve is de COGEM van mening dat er onvoldoende aspecten zijn die voor een lagere inperking van de werkzaamheden kunnen pleiten. Ter bescherming van mens en milieu adviseert de COGEM om de productie van genetisch gemodificeerde influenza A virussen, infectie van dierlijke cellen met deze virussen en handelingen met cellen en weefsels van dieren, conform het voorstel opgesteld door Bureau GGO in respectievelijk onderdeel 3, 4 en 6, in te schalen op ML-III inperkingsniveau met aanvullende voorschriften (6). Deze inschaling is overeenkomstig de inschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (6). Aviaire influenza A virussen kunnen via kleine deeltjes door de lucht worden verspreid (3; 12). Volgens de Regeling GGO (6) dienen werkzaamheden met dergelijke aërogeen overdraagbare virussen plaats te vinden in een veiligheidskabinet van klasse II.

Met betrekking tot aanvullende voorschriften merkt de COGEM het volgende op. De eerste twee aanvullende voorschriften, zoals opgenomen in het voorstel tot inschaling van Bureau GGO, luiden dat medewerkers gevaccineerd zijn tegen *humanaan influenza A virus* én dat medewerkers die symptomen van griep vertonen uitgesloten worden van werkzaamheden. In overweging nemende dat enerzijds influenzavirussen

relatief snel kunnen evolueren tot nieuwe virussen met andere eigenschappen en gastheerbereik als gevolg van onder andere ‘antigene shift’ (1) en dat hierbij het erfelijk materiaal van het ene influenzavirus vermengd wordt met dat van een ander subtype virus. Anderzijds kan dit alleen plaatsvinden indien beide virussen zich in dezelfde cel bevinden. De kans is klein dat een ‘antigene shift’ optreedt. Echter indien het optreedt kan een pathogeen influenzavirus ontstaan met geheel nieuwe eigenschappen en oppervlakte eiwitten, waartegen in de populatie geen antistoffen aanwezig zijn. Vermenging van een humaan influenzavirus met een pathogeen aviaire influenzavirus kan leiden tot het ontstaan van een volledig nieuw pathogeen humaan influenzavirus (‘antigene shift’). Om het geringe risico van ‘antigene shift’ verder te minimaliseren, stemt de COGEM in met de eerder genoemde aanvullende voorschriften dat medewerkers geen griep (influenzavirus) mogen hebben en gevaccineerd moeten zijn tegen humaan *influenza A virus*.

Het derde aanvullend voorschrift in het voorstel tot inschaling van Bureau GGO luidt dat het dragen van een mondkapje, beschermende bril en het innemen van antivirale middelen twee dagen voor aanvang van de studie tot vijf dagen daarna, verplicht is óf dat tijdens de werkzaamheden een volledig gezichtsbeschermend persluchtmasker gedragen wordt. In een veiligheidskabinet klasse II onder ML-III inperkingsniveau is de kans op blootstelling van de medewerker aan virusdeeltjes minimaal. De COGEM is van mening dat het dragen van een mondkapje én een beschermende bril voldoende bescherming bieden bij werkzaamheden in een veiligheidskabinet van klasse II, en dat het dragen van een persluchtmasker of het gebruik van antivirale middelen geen additionele bescherming voor de besmetting van de medewerker biedt.

Derhalve is de COGEM van mening dat de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd dienen te worden met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *influenza A virus*;
- medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- het dragen van een mondkapje van model N95 of hogere specificatie (19) én beschermende bril is verplicht.

Handelingen met proefdieren

Met de geproduceerde virussen zullen kippen, eenden en varkens worden geïnfecteerd. De COGEM is van mening dat de betreffende handelingen zoals omschreven in onderdeel 5 van het voorstel tot inschaling zoals opgesteld door Bureau GGO, ingeschaald dienen te worden op DM-III inperkingsniveau (6). De proefdieren bevinden zich volgens de aanvrager niet in isolatoren maar in diervverblijven. Recombinante aviaire influenza A virussen kunnen uit de proefdieren vrijkomen en

zich via kleine deeltjes door de lucht verspreiden (12). Een andere mogelijke verspreidingsbron is via stofdeeltjes van besmette mest van de proefdieren. De betreffende dierexperimenten hebben qua aantal dieren in een enkel dierverblijf een beperkte omvang in vergelijking met dierstallen van bijvoorbeeld kippen in pluimveebedrijven. Bij een uitbraak van aviaire influenza A is de concentratie van virusdeeltjes in een stal van een pluimveebedrijf groot als gevolg van de hoge dichtheid van pluimvee. In 2003 heeft een dergelijke uitbraak in Nederland en België ertoe geleid dat de blootgestelde mensen voornamelijk oogontsteking opliepen; echter in één geval resulteerde de influenzavirusinfectie in een dodelijke afloop (7). Gezien het feit dat het hier experimenten betreft met een beperkt aantal dieren zal de concentratie van virus- en stofdeeltjes in de lucht gering zijn. Om het risico op besmetting van de medewerker in een dierverblijf te reduceren en om verspreiding van het virus en het ontstaan van een nieuw ziekteverwekkend virus te verhinderen, is de COGEM van mening dat de volgende aanvullende voorschriften voor de handelingen met dieren op een DM-III inperkingsniveau noodzakelijk zijn:

- medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *influenza A virus*;
- medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- het dragen van een mondkapje van model N95 of hogere specificatie (19), beschermende bril, én het innemen van antivirale middelen twee dagen voor aanvang van de studie tot vijf dagen daarna is verplicht (20), óf tijdens de werkzaamheden wordt een volledig gezichtsbeschermend persluchtmasker gedragen;
- bij het verlaten van de onderzoeksruimten wordt gedoucht.

De COGEM merkt op dat uit onderzoek blijkt dat het profylactisch gebruik van antivirale middelen, bijvoorbeeld Tamiflu® (oseltamivir phosphate), infectie met het influenzavirus niet volledig kan voorkomen (20). Derhalve dient het gebruik van antivirale middelen in combinatie met de bovengenoemde aanvullende voorschriften plaats te vinden om de kans op infectie te minimaliseren. Tevens merkt de COGEM op dat het langdurig innemen van antivirale middelen, indien het experiment bijvoorbeeld maanden gaat duren, hinderlijk kan zijn voor de medewerker.

Concluderend is de COGEM van mening dat met inachtneming van de inperkingsmaatregelen en de aanvullende voorschriften de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, blz. 196-209.

2. 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.
3. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., and Skalka, A. M. (2004). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, D.C.
4. 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.
5. Hoffmann, E., Krauss, S., Perez, D., Webby, R., and Webster, R. G. (2002). Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* **20**, blz. 3165-70.
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. Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2002). Generation of influenza A virus from cloned cDNAs--historical perspective and outlook for the new millenium. *Rev Med Virol* **12**, blz. 13-30.
9. Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., and Kawaoka, Y. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 9345-50.
10. Pleschka, S., Jaskunas, R., Engelhardt, O. G., Zurcher, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (1996). A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J Virol* **70**, blz. 4188-92.
11. Steinhauer, D. A. and Skehel, J. J. (2002). Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* **36**, blz. 305-32.
12. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
13. Zambon, M. C. (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* **11**, blz. 227-41.
14. 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.

15. The Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Internet: <http://www.cdc.gov/nip/ACIP/default.htm> (14-05-2004).
16. Avian Influenza, Office International des Epizooties (OIE). Internet: http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm (14-05-2004).
17. World Health Organization (WHO), Internet: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2004_03_17/en/ (14-05-2004).
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Internet: <http://www.cdc.gov/flu/avian/> (14-05-2004).
19. WHO interim recommendations for the protection of persons involved in the mass slaughter of animals potentially infected with highly pathogenic avian influenza viruses, Internet: <http://www.wpro.who.int/avian/docs/recommendations.asp> (14-05-2004).
20. Hayden, F. G., Treanor, J. J., Fritz, R. S., Lobo, M., Betts, R. F., Miller, M., Kinnersley, N., Mills, R. G., Ward, P., and Straus, S. E. (1999). Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* **282**, blz. 1240-6