



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  
IG 99-090/04.co1

Uw brief van  
27 juli 2004

Kenmerk  
CGM/040809-01

Datum  
9 augustus 2004

Onderwerp  
Advies wijzigingsverzoek GGO 99-090

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een verzoek tot wijziging van de vergunning GGO 99-090, getiteld 'Onderzoek naar Influenza Virus', van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, 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 een verzoek tot wijziging van de bestaande vergunning GGO99-090. De aanvrager is voornemens laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante aviaire (in vogels voorkomende) influenza A virussen uit te voeren. De huidige vergunning staat werkzaamheden met laagpathogene influenza virussen toe. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om het onderzoek uit te bereiden met hoogpathogene 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.

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 muizen, kippen, fretten en apen 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 conform 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, bij het uitvoeren van onderhavige 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, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

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

# **Titel: Pathogeniteitsstudies naar hoog- en laagpathogene Influenza A virussen**

**COGEM advies: CGM/040809-01**

## **Inleiding**

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot wijziging van de bestaande vergunning GGO 99-090. De aanvrager is voornemens laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante aviaire influenza A virussen uit te voeren. De huidige vergunning staat werkzaamheden met laagpathogene virussen toe. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om het onderzoek uit te bereiden met hoogpathogene virussen.

Het betreft hier experimenten met het H7N7 *Influenza A virus* dat, in 2003 tijdens de vogelpestuitbraak in Nederland, verschillende mensen geïnfecteerd heeft. Eén persoon is destijds aan de gevolgen van de infectie overleden, achtentachtig anderen vertoonden een mild ziektebeeld (6). Het virus dat uit het slachtoffer is geïsoleerd bleek genetisch in sterke mate te verschillen van het isolaat afkomstig van mensen die milde verschijnselen vertoonden (3).

Vergelijkend onderzoek in muizen, tussen het virus-isolaat uit het slachtoffer en het virus geïsoleerd uit patiënten met een mild ziektebeeld, heeft aangetoond dat het eerstgenoemde virus-isolaat een hogere pathogeniteit bezit. Doel van onderhavig onderzoek is om te bepalen welke genen en mutaties verantwoordelijk zijn voor de verhoogde pathogeniteit.

## **Influenza A virussen**

Het influenzavirus dat ook wel bekend staat als het griepvirus is een negatief-strengig RNA virus. Het 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 infecteert. Het *Influenza A virus* heeft een RNA genoom bestaande uit acht unieke gensegmenten. Het totale genoom codeert voor tien eiwitten, waaronder haemagglutinine (HA), neuraminidase (NA), matrixeiwitten M1 en M2, niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, en drie polymerasecomplexen (PB1, PB2 en PA)(1;10;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 gastheer, 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).

Influenzavirussen worden geclassificeerd op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus*, 15 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H15) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend (1;11). Bij vogels komen alle subtypen voor terwijl bij de mens voor zover bekend alleen H1, H2, H3, N1, N2, N7 en recentelijk ook H5, H7 en H9 voorkomen (2).

### Overdracht

In het verleden hebben verschillende pandemieën van het *Influenza A virus* vele slachtoffers geëist. Zo heeft de Spaanse griep in 1918 het leven gekost aan naar schatting 20 tot 40 miljoen mensen. Ook aan de gevolgen van de Aziatische griep van 1957 en de Hongkong griep van 1968 zijn tienduizenden mensen gestorven. De Influenza A virussen die vogels infecteren (aviaire influenza A) veroorzaken bij vogels doorgaans asymptomatische of milde infecties. Sommige stammen evolueren echter tot hoog pathogene influenzavirussen wanneer overdracht plaatsvindt van wilde watervogels naar pluimvee en de zogenoemde vogelgriep of vogelpest ontstaat. Het aviaire 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 (14).

Wilde vogels zijn 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 (13). Tot voor enkele jaren werd aangenomen dat het aviaire *Influenza A virus* niet rechtstreeks mensen kon infecteren en dat een varken noodzakelijk was als intermediair. In 1997 werd in Hong Kong echter het tegendeel bewezen. Het subtype H5NI, verantwoordelijk voor een vogelgriepuitbraak, is destijds direct van vogels naar mensen overgedragen. Achttien personen zijn opgenomen in het ziekenhuis en zes van hen zijn uiteindelijk aan de gevolgen van de infectie overleden (16). Na deze uitbraak zijn er nog meerdere gevallen van directe transmissie van het aviaire Influenza A virus naar mensen geconstateerd (16). Zoals hierboven vermeld heeft dit verschijnsel zich ook voorgedaan in Nederland. Het betrof overigens een ander subtype *Influenza A virus* (H7N7) dan in Hong Kong. Voor zover nu bekend kan het vogelgriepvirus zich niet van mens tot mens verspreiden. Als dit wel mogelijk wordt zou een nieuwe pandemie kunnen uitbreken.

## Adviesvraag

Uit het verleden is gebleken dat een infectie met het influenza subtype H7N7 bij mensen kan lijden tot milde symptomen zoals oogontsteking (conjunctivitis). In één geval heeft een infectie met het subtype het leven gekost aan een dierenarts die ten tijde van de vogelgriep uitbraak met H7N7 geïnfecteerd pluimvee heeft bezocht.

De virussen die een mild ziektebeeld (bijvoorbeeld A/NL/33/03) veroorzaakten waren vrijwel genetisch identiek aan het virus dat uit kippen werd geïsoleerd (A/Chicken/NL/103). Onderzoek heeft echter uitgewezen dat het virus afkomstig van de fatale casus (A/NL/219/03) genetisch sterk afwijkt van het virus afkomstig van patiënten met een mild ziektebeeld (A/NL/33/03). In het A/NL/219/03 virus zijn in vergelijking met het A/NL/33/03, 26 puntmutaties verspreid over 7 van de 8 gensegmenten waargenomen, waarvan 14 mutaties resulteren in een aminozuurverandering (in 5 van de 8 gensegmenten) (3). Onderzoek met muizen heeft vervolgens aangetoond dat het A/NL/219/03 virus een verhoogde pathogeniteit bezit in vergelijking met het A/NL/33/03 virus afkomstig van patiënten met een mild ziektebeeld.

Het doel van onderhavige experimenten is om te bepalen welke genen en welke puntmutaties in het A/NL/219/03 virus verantwoordelijk zijn voor de verhoogde pathogeniteit. Hiertoe worden dezelfde experimenten uitgevoerd zoals vergund onder GGO 99-090 met het verschil dat er in onderhavige experimenten gebruik gemaakt wordt van virussen behorend tot een hogere pathogeniteitsklasse.

Van de virussen A/Chicken/NL/103, A/NL/33/03 en A/NL/219/03 worden de 8 gensegmenten ieder afzonderlijk gekloneerd in *Escherichia coli* plasmiden. Ieder plasmide (pcDNA3) bevat één gensegment van het *Influenza A virus*, geflankeerd door een promotor en een ribozym. Combinaties van 8 plasmiden (de 8 gensegmenten van de verschillende virussen) worden vervolgens getransfecteerd in zoogdiercellen waardoor de cellen recombinant *Influenza A virus* gaan produceren. In eerste instantie zullen gensegmenten tussen de virussen onderling worden uitgewisseld, hierna zullen er specifiek puntmutaties worden aangebracht in verschillende gensegmenten. Door het uitwisselen van gensegmenten en/of specifieke sequenties kan achterhaald worden welke eiwitten en/of gensequenties betrokken zijn bij de pathogenese en verspreiding van het virus. De nieuw gevormde virussen zullen vermeerderd worden in cellijnen of kippeneieren.

De pathogeniteit van de nieuw verworven virussen wordt hierna getest op muizen. De muizen worden hiertoe geïnfecteerd waarna ze regelmatig bemonsterd worden. Ook worden tijdens de infectie, enkele dieren gedood om onderzoek te kunnen verrichten aan de organen. Van de monsters zullen met behulp van PCR en viruskweek de virustiters bepaald worden. In eerste instantie zullen voor deze experimenten alleen muizen (*Mus musculus*) worden gebruikt maar in een later

stadium zullen mogelijk ook kippen (*Gallus domesticus*), fretten (*Mustela putorius furo*) en apen (*Macaca fascicularis*) voor het onderzoek ingezet worden. Tevens zullen op een later tijdstip mogelijk andere hoogpathogene influenza A virussen, zoals het H5N1 virus dat de vogelpest in 1997, 2003 en 2004 in Azië veroorzaakte en daarbij ook mensen infecteerde, op dezelfde wijze onderzocht worden.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de voorgenomen pathogeniteitsstudies.

### **Eerder COGEM advies**

Op 26 maart jl. heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van influenza A virussen (CGM/040326-03). De COGEM heeft destijds 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 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 (5). De COGEM heeft destijds eveneens geadviseerd 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.

Mede op basis van dit advies heeft de COGEM recentelijk geadviseerd (CGM/040518-02) over een aanvraag van CIDC-Lelystad waarbij het soortgelijke experimenten als in de onderhavige aanvraag betref. Ook hier werden chimere recombinant influenza A virussen geproduceerd, die zijn samengesteld uit hoog en laag pathogene influenza A virussen. De COGEM heeft destijds geadviseerd de klonering en expressie van de afzonderlijke gensegmenten in *E. coli* plasmiden, plaats te laten vinden op ML-I niveau. Zij heeft verder geadviseerd de productie van genetisch gemodificeerde influenza A virussen, infectie van dierlijke cellen met deze virussen en handelingen met cellen en weefsels van dieren, in te schalen op ML-III inperkingsniveau met aanvullende voorschriften (5). Deze inschaling is overeenkomstig de inschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (5). Voor de handelingen met proefdieren werd een inschaling van werkzaamheden op een DM-III verblijf noodzakelijk geacht.

## Overwegingen en advies

### Handelingen in laboratoria

De aanvrager heeft in een vergelijkend onderzoek met muizen aangetoond dat het A/NL/219/03 virus een verhoogde pathogeniteit bezit ten opzichte van het A/NL/33/03 virus. Op basis van deze informatie wordt het A/NL/219/03 virus beschouwd als een virus van pathogeniteitsklasse 3. Werkzaamheden met deze virussen dienen plaats te vinden op minimaal ML-III niveau. Deze indeling is zowel gebaseerd op basis van het COGEM advies CGM/040326-03 waarin de COGEM adviseert zowel de hoog als laag pathogene stammen van het aviaire *Influenza A virus* te beschouwen als pathogeniteitsklasse 3 virussen, als op basis van de oude Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling. Omdat in onderhavig onderzoek recombinante virussen geproduceerd worden middels gensegmenten 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;4;7-9). Derhalve is de COGEM van mening dat er onvoldoende aspecten zijn die voor een lagere inperking (<ML III) van de werkzaamheden kunnen pleiten.

Ter bescherming van mens en milieu adviseert de COGEM om de klonering en expressie van alle gensegmenten in *E.coli* in te schalen op ML-I niveau. Het betreft hier de expressie van individuele gensegmenten die afzonderlijk niet tot een infectieus virus kunnen leiden.

De COGEM adviseert verder 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 2, 3 en 5 in te schalen op ML-III inperkingsniveau met aanvullende voorschriften (5). Deze inschaling is overeenkomstig de inschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (5). Aviaire influenza A virussen kunnen via kleine deeltjes door de lucht worden verspreid (2;11). Volgens de Regeling GGO (5) 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 *humana influenza A virus* en 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 aviair influenzavirus kan leiden tot het ontstaan van een volledig nieuw pathogeen humaan influenzavirus ('antigene shift'). Om het geringe risico van 'antigene shift' te minimaliseren, stemt de COGEM in met de eerder genoemde aanvullende voorschriften dat medewerkers geen symptomen van griep (influenzavirus) mogen hebben en gevaccineerd moeten zijn tegen humaan *Influenza A virus*. Hiernaast wijst de COGEM erop dat neuraminidase remmers zoals Tamiflu®, in het geval van een infectie met het (recombinante) influenza virus of verdenking daarvan, beschikbaar moeten zijn voor de laboratorium medewerkers.

Het derde aanvullende voorschrift in het voorstel tot inschaling van Bureau GGO luidt dat het dragen van een neus- en mondmasker (minimaal N95 of vergelijkbare hogere specificatie) en een beschermende bril verplicht is. De COGEM stemt hiermee in gezien het feit dat in een veiligheidskabinet klasse II onder ML-III inperkingniveau de kans op blootstelling van de medewerker aan virusdeeltjes minimaal is.

Samenvattend 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;
- alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden;
- het dragen van een mondkapje van model N95 of hogere specificatie (17) én beschermende bril is verplicht.

#### Handelingen met proefdieren

Met de geproduceerde virussen zullen muizen en in een later stadium mogelijk kippen, fretten en apen, worden geïnfecteerd. De COGEM is van mening dat de betreffende handelingen, omschreven in onderdeel 4 van het voorstel tot inschaling zoals opgesteld door Bureau GGO, ingeschaald dienen te worden op DM-III inperkingsniveau (5). De DM-III faciliteit van de aanvrager beschikt over onderdruk isolatoren waarin de proefdieren gehuisvest zullen worden. Hierdoor is de kans dat werknemers in aanraking komen met het recombinante influenza A virussen verwaarloosbaar klein.

Derhalve adviseert de COGEM de voorgenomen handelingen met proefdieren plaats te laten vinden in een DM-III verblijf met inachtneming van het volgende aanvullende voorschrift.



- de dieren worden in onderdrukisolatoren gehuisvest.

Concluderend is de COGEM van mening dat, met inachtneming van de inperkingsmaatregelen en de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de betreffende experimenten verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Brown, E.G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**: 196-209
2. 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.
3. Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., and Osterhaus, A.D. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 1356-1361
4. 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**: 3165-3170
5. Integrale versie van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. (2003)
6. 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**: 587-593
7. Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2004). Generation of influenza A virus from cloned cDNAs--historical perspective and outlook for the new millenium. *Rev Med Virol* **12**: 13-30
8. 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* **96**: 9345-9350
9. 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**: 4188-4192
10. Steinhauer, D.A. and Skehel, J.J. (2002). Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* **36**: 305-332
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**: 227-241
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**: 8851-8856
14. Avian Influenza, Office International des Epizooties (OIE). Internet: [http://www.oie.int/eng/AVIAN\\_INFLUENZA/home.htm](http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm) (4-08-2004)
15. The Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Internet: <http://www.cdc.gov/nip/ACIP/default.htm> (4-08-2004)
16. Avian influenza infection in humans. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Internet : <http://www.cdc.gov/avian/gen-info/avian-flu-humans.htm> (2-08-2004)
17. 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> (2-7-2004)