



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 99-090/05.co1

Uw brief van
11 januari 2005

Kenmerk
CGM/050201-01

Datum
1 februari 2005

Onderwerp
Advies IG 99-090/05

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 99-090, getiteld 'Onderzoek naar Influenza Virus', van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, en het 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 IG 99-090. De aanvrager is voornemens laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante virussen van laag- en hoogpathogene influenza A virussen afkomstig uit alle mogelijke gastheren uit te voeren. De huidige vergunning staat werkzaamheden met een beperkt aantal influenzavirussen toe. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om het onderzoek uit te breiden, waarbij verzocht is om een aantal experimenten op een lager inperkingsniveau (ML-II) uit te voeren. Het doel van het onderzoek is om te bepalen welke delen van het genoom van het virus verantwoordelijk zijn voor de virulentie. Tevens staat het onderzoek in het teken van vaccinontwikkeling.

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 dienen uitgevoerd te worden op DM-III niveau. Experimenten waarbij ten behoeve van vaccinontwikkeling recombinante influenzavirussen geproduceerd worden op basis van niet-virulente verzwakte laboratoriumstammen kunnen onder bepaalde voorwaarden op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. Om het risico van verspreiding van het recombinante virus in te perken acht de COGEM aanvullende voorschriften 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

Voorzitter COGEM

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

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

Titel: Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen

COGEM advies: CGM/050201-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot wijziging van de bestaande vergunning GGO 99-090, getiteld "Onderzoek naar Influenza Virus". De aanvrager is voornemens laboratoriumhandelingen en dierproeven uit te voeren met influenza A virussen uit alle mogelijke gastheren, waaronder vogels, mensen, varkens, paarden, katten en zeezoogdieren. De huidige vergunning staat werkzaamheden toe met laagpathogene virussen en enkele hoogpathogene influenza A virussen, zoals het subtype H7N7. De aanvrager heeft een verzoek ingediend om het onderzoek uit te breiden met onder andere humane H1N1 virussen geïsoleerd vóór 1957, humane H2N2 virussen van 1957 tot 1968 en H3N2 virussen geïsoleerd van 1968 tot heden, waarbij de aanvrager verzocht heeft om een aantal werkzaamheden op een lager inperkingsniveau in te schalen. De aanvraag omvat echter géén activiteiten met het influenzavirus welke geleid heeft tot het uitbreken van de Spaanse griep in 1918.

Doel van onderhavig onderzoek is ondermeer om te bepalen welke genen en mutaties verantwoordelijk zijn voor de pathogeniteit, gastheerbereik en transmissie van influenza virussen. Daarnaast zal onderzoek gedaan worden naar 'antigene drift'. Bij dit proces van 'antigene drift' ondergaan influenza virussen genetische veranderingen waardoor het virus niet meer herkend wordt door de aanwezige antistoffen van het afweersysteem. Tot slot zal een deel van het onderzoek in het teken staan van het ontwikkelen van een vaccin.

Influenza A virussen

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus. Dit negatief-strengig RNA virus behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en wordt onderverdeeld in drie typen, te weten Influenza A, B en C (1; 2). Het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren, terwijl het *Influenza B* en *C virus* hoofdzakelijk mensen infecteert. Het RNA genoom van het *Influenza A virus* bestaat 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; 3; 4). 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 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 (3; 5).

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; 3; 6). 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 (7).

Evolutie

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 (8; 9). De Influenza A virussen die vogels infecteren (aviaire influenza A) veroorzaken bij vogels doorgaans asymptomatische of milde infecties. Wanneer overdracht plaatsvindt van wilde watervogels naar pluimvee, kunnen sommige stammen evolueren tot hoogpathogene influenzavirussen. Het aviaire virus wordt verspreid door intensief contact met besmette pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en via kleine stofdeeltjes door de lucht (1; 7). Door mutaties en het uitwisselen van genoomsegmenten tussen influenzavirussen kunnen laagpathogene influenzavirussen evolueren tot hoogpathogene virussen. Als gevolg van dit proces van 'antigene shift' wordt het erfelijk materiaal van het ene influenzavirus vermengd met dat van een ander subtype virus (3; 7; 8). Dit kan alleen plaatsvinden indien beide virussen zich in dezelfde cel bevinden. Gezien het feit dat een influenzavirus bestaat uit acht verschillende genoomsegmenten, kunnen er theoretisch 256 unieke combinaties gevormd worden (3). 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.

Virusuitbraken

In het verleden zijn diverse hoogpathogene influenza virussen ontstaan die verschillende pandemieën veroorzaakt hebben (10). De Spaanse griep in 1918 heeft het leven gekost aan naar schatting 20 tot 40 miljoen mensen. Ook aan de gevolgen van de Aziatische griep van 1957 (subtype H2N2) en de Hongkong griep van 1968 (subtype H3N2) zijn tienduizenden mensen gestorven (9). Tijdens uitbraken in 1997 van hoogpathogene influenza virussen van type H5N1 in Azië (Hong Kong) zijn 18 mensen besmet geraakt waarvan 6 zijn overleden (11; 12). In 2003 was het subtype H7N7 in Nederland en België oorzaak van het uitbreken van vogelgriep, waarbij één dode is gevallen (13). Recentelijk zijn in Zuidoost Azië (Thailand en Vietnam)

wederom uitbraken met hoogpathogene aviaire influenza (H5N1), waarbij 41 van de 54 besmette mensen zijn overleden (WHO, 26 januari 2005). 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. Echter, in 1997 werd in Hong Kong vastgesteld dat het verantwoordelijke subtype H5NI direct van vogels naar mensen overgedragen kon worden (9; 10). Recentelijk is een mogelijke directe transmissie van hoogpathogene influenzavirus (H5N1) van mens naar mens in Thailand waargenomen. Aanvankelijk was bij mensen alleen een vrij onschuldige conjunctivitis bekend, maar nu is gebleken dat ook infectie van de luchtwegen kan optreden, vaak met dodelijke afloop (14).

Pathogeniteit

De pathogeniteit van influenza A virussen wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten die bijdragen aan de virulentie zijn de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, de polymerasecomplexen PB1 en PB2, en HA en NA (2; 5; 12; 15-18). Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong avirulente virusstam virulent te maken (3; 6; 7; 12). Het HA eiwit in een geïnfecteerde cel heeft een specifieke klievingplaats voor een cellulair protease. Voor de infectiviteit van het virus is het klieven van het HA eiwit in HA1 en HA2 een belangrijke stap. 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 een serie basische aminozuren in deze klievingplaats zorgt ervoor dat ook andere proteasen (PC1 en furine), die actief zijn in andere cellen, het HA eiwit kunnen klieven (6; 7; 12). Hierdoor verandert de specificiteit en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit (3; 7; 19). Uit de influenzavirus-uitbraken in het verleden blijkt dat de aanwezigheid van basische aminozuren in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing is voor de pathogeniteit van het virus. Dit kenmerk is echter niet aanwezig in de hoogpathogene influenzastam uit 1918, die verantwoordelijk is voor de Spaanse griep (20-23).

De gastheerspecificiteit van het influenzavirus 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 (6; 24). Varkens bezitten beide typen receptoren en worden daarom als mengvat gezien voor het ontstaan van potentiële pathogene influenzavirussen. 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 humane cellen te infecteren en vice versa (7).

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, gezien het feit dat influenza A virussen in staat zijn om op een relatief eenvoudige manier te adapteren 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 (25). De COGEM heeft destijds eveneens geadviseerd dat ggo activiteiten met influenza A virussen van geval tot geval beoordeeld dienen te worden. Specifieke activiteiten kunnen, op basis van de aard van de experimenten, keuze van virusstammen of virale sequenties, op een lager inperkingsniveau ingeschaald worden, waarbij 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 waarbij chimere recombinant influenza A virussen geproduceerd werden, die waren samengesteld uit hoog- en laagpathogene influenza A virussen. De COGEM heeft geadviseerd dat klonering en expressie van de afzonderlijke gensegmenten in *E. coli* plasmiden, op ML-I niveau uitgevoerd konden worden. De commissie 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 (25). Deze inschaling is overeenkomstig de inschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (25). Voor de handelingen met proefdieren werd een inschaling van werkzaamheden op een DM-III verblijf noodzakelijk geacht.

Daarnaast heeft de COGEM eerder over een wijziging (IG 99-090/04) van de onderhavige vergunningaanvraag geadviseerd (CGM/040809-01). Het betrof hier experimenten met het hoogpathogene H7N7 influenzavirus uit 2003 (13). In de experimenten zijn chimere virussen geproduceerd bestaande uit laagpathogene influenzavirussen en het H7N7 influenza virus, met als doel om te bepalen welke genen en puntmutaties in het H7N7 subtype verantwoordelijk zijn voor de pathogeniteit. Op basis van het feit dat het experimenten betrof met hoogpathogene virussen en omdat een reële kans aanwezig was dat er recombinante virussen met een hoge virulente konden ontstaan, heeft de COGEM de werkzaamheden ingeschaald op ML-III inperkingsniveau met aanvullende voorschriften (25). Evenals voor de handelingen met proefdieren zijn de werkzaamheden op DM-III inperkingsniveau ingeschaald overeenkomstig met de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (25).

Adviesvraag

De aanvrager is voornemens experimenten uit te voeren waarbij recombinante virussen gecreëerd zullen worden door het uitwisselen van (delen van) gensegmenten tussen pathogene en minder pathogene virussen. De aanvrager heeft de beschikking over een grote collectie hoog- als laagpathogene influenzavirussen afkomstig uit onder andere mensen, vogels, paarden, katten en varkens. Hiertoe behoren ook de influenza A virusstammen verantwoordelijk voor de pandemieën in 1957 en 1968. Volgens de aanvrager zullen géén activiteiten uitgevoerd worden met de 1918 virusstam (H1N1) die geleid heeft tot het uitbreken van de Spaanse griep. De gemuteerde en chimere virussen zullen in een aantal proefdiermodellen (muizen, fretten, katten, varkens, apen, kippen en eenden) op ondermeer pathogeniteit, gastheerbereik en transmissie getest worden. Daarnaast zullen functies van de individuele genen HA en NA van influenza virussen onderzocht worden, alsmede de activiteit van de polymerase eiwitten (PB1, PB2, PA, NP). Voorts zullen recombinante influenzavirussen gegenereerd worden ten behoeve van vaccinontwikkeling tegen ondermeer de virussubtypen H5, H7 en H9. In het verlengde hiermee worden ook mutaties in het influenzavirus gemaakt voor het onderzoek naar 'antigene drift'.

Voor een aantal werkzaamheden heeft de aanvrager verzocht om deze onder ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren. Eén van de werkzaamheden staat in het teken van vaccinontwikkeling waarbij recombinante virussen geproduceerd worden op basis van de geattenueerde influenzavirustypen A/PR/8/34 (H1N1) of A/WSN/33 (H1N1) (26). Daarnaast betreft het experimenten waarbij mutaties aangebracht worden in laagpathogene influenza virussen, waarbij volgens de aanvrager redelijkerwijs of op grond van de literatuur niet verwacht mag worden dat ze fenotypische veranderingen ondergaan, waardoor ze pathogeen worden, gastheer veranderingen tot gevolg hebben of voordelen hebben ten opzicht van epidemische influenzavirussen (2; 12; 15-18).

De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de voorgenomen studies. In het bijzonder is de COGEM gevraagd te adviseren welke experimenten onder welke voorwaarden op een lager inperkingsniveau (ML-II) uitgevoerd mogen worden.

Overwegingen en advies

In de voorgenomen experimenten worden met influenzavirussen uit alle mogelijke gastheren studies uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in de pathogeniteit, gastheerbereik en transmissie van influenzavirussen. Op grond van de pathogeniteitsklasse 3 van influenzavirussen worden ggo activiteiten met deze

virussen door de COGEM minimaal ingeschaald op niveau ML-III of DM-III (25). Een aantal experimenten met laagpathogene influenzavirussen kunnen volgens de aanvrager lager ingeschaald (ML-II) worden. Het betreft enerzijds experimenten waarbij recombinante chimere influenzavirussen geproduceerd worden op basis van geattenueerde virussen, en anderzijds experimenten waarbij mutaties aangebracht worden in laagpathogene influenzavirussen.

Vaccinontwikkeling met recombinante laagpathogene influenzavirussen

De aanvrager is voornemens om chimere influenzavirussen te produceren op basis van de geattenueerde influenzavirustypen A/PR/8/34 of A/WSN/33 (26). De recombinante virussen zullen uit 6 of 7 gensegmenten van deze geattenueerde influenzavirussen bestaan en 1 of 2 gensegmenten van andere influenzavirussen, met uitzondering van de 1918 virusstam. De aanvrager geeft als voorwaarde dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat. Daarbij stelt de aanvrager dat in de heterologe gensegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht zijn.

Van beide virusstammen, en met name van A/PR/8/34, is mede op grond van literatuurgegevens bekend dat ze avirulent en sterk geattenueerd zijn voor mensen (27-30). Eerdere experimenten hebben aangetoond dat recombinante virussen, die bestaan uit 6 segmenten van A/PR/8/34 (H1N1) en 2 segmenten van het HA en NA van wild-type humaan influenza virus, niet virulent zijn voor mensen (27). De mate van attenuatie blijkt voorts verder toe te nemen indien de recombinante virussen meer A/PR/8/34 gensegmenten bevatten (27). Verwijdering van de basische klievingplaats in het HA eiwit van het hoogpathogene H5N1 influenzavirus zal de pathogeniteit voor mensen drastisch verminderen (12). Recombinante virussen bestaande uit 6 gensegmenten van A/PR/8/34, het NA gen van het H5N1 virus en het HA gen zonder de basische aminozuren van het H5N1 virus zal volgens de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) niet pathogeen zijn (27; 30).

Voor de A/WSN/33 stam (H1N1) zijn er minder gegevens over chimere bekend (26). Dit influenzavirus is voor het eerst in 1940 ontwikkeld door intensieve passages in celkweek met de oorspronkelijke WS/33 stam. De A/WSN/33 stam bezit de eigenschap dat het buiten de normale gastheercellen kan repliceren, waardoor het virus interessant is voor laboratoriumonderzoek. Het virus is laagpathogeen voor zoogdieren (onder andere mensen), met uitzondering van muizen (29). Uit literatuurgegevens blijkt dat het virus veelvuldig in diverse laboratoria gebruikt is zonder dat dit, voor zover bekend, heeft geleid tot risico's voor mens en milieu (22; 26; 29).

Derhalve is de COGEM van mening dat de kans minimaal is dat, door het uitwisselen van maximaal twee gensegmenten van de geattenueerde virusstammen A/PR/8/34 of A/WSN/33, recombinante virussen ontstaan met veranderingen in transmissie, pathogeniteit, en fitness in vergelijking met de A/PR/8/34 of A/WSN/33

stammen. Daarom kunnen werkzaamheden met virussen bestaande uit minimaal 6 of 7 gensegmenten van de A/PR/8/34 of A/WSN/33 stam en 1 of 2 gensegmenten van andere influenzavirussen, volgens de COGEM op ML-II inperkingniveau uitgevoerd worden. Daarbij stelt de COGEM als voorwaarde dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat. Aangezien influenzavirussen door de lucht verspreid kunnen worden (aërogeen), acht de COGEM aanvullende voorschriften noodzakelijk, zoals vermeld in eerdere COGEM adviezen (CGM/040326-03, CGM/040518-02 en CGM/040809-01), om het risico van verspreiding en besmetting verder te reduceren (1; 7).

Concluderend kunnen de werkzaamheden met virussen die voldoen aan de hierboven genoemde eisen ten behoeve van vaccinontwikkeling, waaronder productie van recombinante influenza A virussen, infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en handelingen met cellen en weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd 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 handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht;
- het dragen van een mondkapje van model N95 of hogere specificatie (31) én beschermende bril is verplicht.

Voor infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met genetisch gemodificeerde influenza A virussen stelt de COGEM de volgende additionele aanvullende voorschriften voor:

- 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.

Virulentie onderzoek met laagpathogene influenzavirus mutanten

Voorts heeft de aanvrager verzocht om met laagpathogene gemuteerde influenzavirussen onder ML-II condities te werken. Het betreft hier onder andere de laboratoriumstammen A/PR/8/34 en A/WSN/33. Van beide virusstammen is bekend dat ze niet virulent zijn voor mensen (26-28; 30). Daarnaast betreft het virussen die momenteel jaarlijkse epidemieën veroorzaken bij mensen (H3N2, 1968-heden en H1N1, 1977-heden), zogenaamde griepvirussen. Deze virussen veroorzaken volgens de aanvrager over het algemeen milde infecties. De aanvrager stelt dat tegen deze virussen in de bevolking immuniteit bestaat en daardoor beschouwd kunnen worden als laagpathogene influenzavirussen. Echter, er zullen altijd individuen zijn die niet

immuun of erg kwetsbaar zijn, waardoor een dergelijk 'onschuldig' influenzavirus bij deze personen ernstige infecties kunnen veroorzaken. Andere influenzavirussen die in de experimenten betrokken kunnen worden, zijn in de natuur voorkomende laagpathogene influenzavirussen afkomstig van ander andere varkens (H3N2, H1N1), paarden (H3N8, H7N7), vogels, walvissen, zehonden, fretten, katten, honden en kamelen. Van slechts enkele virussen is bekend dat ze infectieus zijn voor de mens. Volgens de aanvrager betrof het in deze gevallen zeer milde infecties waarbij de virussen niet tussen mensen onderling werden overgedragen.

Het betreft in deze aanvraag experimenten met bovengenoemde laagpathogene influenzavirussen, waarbij in één of meerdere genen van het oudervirus (punt)mutaties worden aangebracht. Er vindt géén uitwisseling van genen tussen verschillende influenzavirussen plaats. Hierbij wordt door de aanvrager een uitzondering gemaakt voor mutaties die kunnen leiden tot veranderingen in receptor specificiteit van het HA of NA eiwit, en in de gastheerspecificiteit van het polymerasecomplex van het influenzavirus. De aanvrager geeft aan dat deze experimenten op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd dienen te worden. Mutaties waarvan bekend is dat ze dergelijke fenotypische veranderingen teweeg kunnen brengen zijn volgens de aanvrager op positie 627 van het PB2 eiwit (12), positie 92 van het NS1 eiwit (18), posities 98, 134-138, 153, 155, 183, 190, 194, 224-229 en de basische klievingplaats van het HA eiwit (15; 16), en tot slot posities 118, 119, 151, 152, 224, 227, 275-277, 292, 371 en 431 van het NA eiwit (2; 17). Met betrekking tot andere mutaties die kunnen worden aangebracht in influenza A virussen, stelt de aanvrager dat het zeer onwaarschijnlijk is dat dergelijke mutaties zullen leiden tot veranderingen in virulentie of gastheerbereik van het virus.

De aanvrager geeft echter aan, dat deze lijst mogelijk niet uitputtend is en dat resultaten uit eigen onderzoek kunnen leiden tot aanvulling van eerder genoemde mutaties. Dit impliceert volgens de COGEM dat mutaties gevonden kunnen worden die bijdragen aan de pathogeniteit, gastheerbereik of transmissie. Uit de literatuur blijkt dat positie 146 in het NA eiwit van invloed is op de pathogeniteit van het A/WSN/33 influenzavirus voor muizen (6; 22). Het NA eiwit van A/WSN/33 bindt en activeert een protease dat verantwoordelijk is voor de klieving van het HA eiwit (22). Het A/WSN/33 influenzavirus (H1N1) is afgeleid van de 1918 stam en zowel het HA eiwit van de 1918 stam als de A/WSN/33 stam bevat géén serie basische aminozuren. Het is echter nog niet duidelijk of dezelfde mutatie op positie 146 ook in de 1918 stam voorkomt (22). Klieving van het HA eiwit speelt dus een belangrijke rol bij de pathogeniteit van het influenzavirus, maar het is waarschijnlijk dat andere factoren ook van invloed zijn op de virulentie van het influenzavirus (6; 20-23). Zo hebben bepaalde aminozuur veranderingen rond de receptor-bindingsplaats in het HA eiwit effect op de binding van de receptor (32). Tevens zijn er volgens de COGEM concrete aanwijzingen dat de pathogeniteit, gastheerbereik of transmissie van influenzavirussen

beïnvloed wordt door bepaalde residuen in het PB1 en PA eiwit. Ook de glycosylering van het HA eiwit is mogelijk van invloed op de virulentie van het virus (10; 33; 34).

De COGEM is van mening dat de bovengenoemde moleculaire criteria die door de aanvrager gegeven worden, met betrekking tot mutaties die kunnen leiden tot toename in virulentie, niet eenduidig zijn. De door de aanvrager genoemde lijst met mutaties, waarvan bekend is dat ze van invloed zijn op de virulentie van het influenzavirus, is hoogstwaarschijnlijk onvolledig. Door het aanbrengen van puntmutaties in laagpathogene influenzavirussen is er derhalve een reële kans aanwezig dat daarbij influenzavirussen ontstaan die pathogeen zijn geworden, een gastheerverandering hebben ondergaan, of voordelen verworven hebben ten opzichte van epidemische virussen. Derhalve is de COGEM van mening dat er onvoldoende aspecten zijn die voor een lagere inperking (ML-II) van de voorgenomen werkzaamheden kunnen pleiten. Het betreft de werkzaamheden waarbij genetisch gemodificeerde influenzavirussen geproduceerd worden, geëmbryoneerde kippeneieren met deze virussen geïnfecteerd worden en handelingen uitgevoerd worden met cellen en weefsels van dieren. De COGEM is van mening dat experimenten waarbij mutaties worden aangebracht in laagpathogene influenzavirussen op ML-III inperkingsniveau ingeschaald dienen te worden met aanvullende voorschriften, conform eerdere COGEM adviezen (CGM/040326-03, CGM/040518-02 en CGM/040809-01). Deze inschaling is overeenkomstig de inschaling voor laboratoriumwerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen (25).

Samenvattend is de COGEM van mening dat de door de aanvrager voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden (Virulentie onderzoek met laagpathogene influenzavirus mutanten) 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 (31) én beschermende bril is verplicht.

Voor infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met genetisch gemodificeerde influenza A virussen stelt de COGEM de volgende additionele aanvullende voorschriften voor:

- 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.

Handelingen met proefdieren

Met de geproduceerde virussen zal een scala aan proefdieren (muizen, fretten, katten, varkens, apen, kippen en eenden) worden geïnfecteerd. Hierbij wordt de pathogene eigenschap, virusvermeerdering in verschillende organen, en transmissie tussen proefdieren onderling onderzocht. De COGEM is van mening dat alle handelingen in dieren, inclusief die met de recombinante virussen geproduceerd op ML-II inperkingsniveau, ingeschaald dienen te worden op DM-III inperkingsniveau, omdat de inperkingsmogelijkheden voor dierexperimenten beperkter zijn dan voor laboratoriumwerkzaamheden (25). Recombinante influenzavirussen kunnen uit de proefdieren vrijkomen en zich via kleine deeltjes door de lucht verspreiden (1; 7). Een andere mogelijke verspreidingsbron is via stofdeeltjes van besmette mest van de proefdieren. 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 het volgende aanvullende voorschrift voor de handelingen met dieren op een DM-III inperkingsniveau noodzakelijk is:

- de dieren worden in onderdrukisolatoren gehuisvest.

Conclusie

De COGEM is van mening dat alleen experimenten ten behoeve van vaccinonderzoek op basis van de virusstammen A/PR/8/34 en A/WSN/33, zoals weergegeven onder de paragraaf "Vaccinontwikkeling met recombinante laagpathogene influenzavirussen", uitgevoerd kunnen worden op ML-II inperkingsniveau met aanvullende voorschriften. Alle overige werkzaamheden met recombinante influenzavirussen dienen op ML-III inperkingsniveau met aanvullende voorschriften uitgevoerd te worden, conform eerdere COGEM adviezen (CGM/040326-03, CGM/040518-02 en CGM/040809-01). Handelingen met dieren dienen op DM-III inperkingsniveau uitgevoerd te worden, waarbij de dieren in onderdrukisolatoren gehuisvest zijn. Met inachtneming van de inperkingsmaatregelen en de aanvullende voorschriften, zijn volgens de COGEM de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de betreffende experimenten verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
2. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
3. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, blz. 196-209
4. Steinhauer, D. A. and Skehel, J. J. (2002). Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* **36**, blz. 305-32
5. Zambon, M. C. (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* **11**, blz. 227-41
6. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2001). Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* **14**, blz. 129-49
7. 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.
8. 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
9. Palese, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nat Med* **10**, blz. S82-7
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S. F., Kitphati, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uiprasertkul, M., Boonnak, K., Pittayawonganon, C., Cox, N. J., Zaki, S. R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Khontong, R., Simmerman, J. M., and Chunsutthiwat, S. (2005). Probable Person-to-Person Transmission of Avian Influenza A (H5N1). *N Engl J Med*
15. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**, blz. 152-79
16. Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I., and Kawaoka, Y. (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of

H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* **74**, blz. 8502-12

17. Kobasa, D., Kodihalli, S., Luo, M., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Suzuki, Y., Suzuki, T., and Kawaoka, Y. (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J Virol* **73**, blz. 6743-51

18. Seo, S. H., Hoffmann, E., and Webster, R. G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**, blz. 950-4

19. Ito, T., Goto, H., Yamamoto, E., Tanaka, H., Takeuchi, M., Kuwayama, M., Kawaoka, Y., and Otsuki, K. (2001). Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* **75**, blz. 4439-43

20. Stevens, J., Corper, A. L., Basler, C. F., Taubenberger, J. K., Palese, P., and Wilson, I. A. (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* **303**, blz. 1866-70

21. Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V., and Taubenberger, J. K. (1999). Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 1651-6

22. Goto, H. and Kawaoka, Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, blz. 10224-8

23. Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfmann, P., Theriault, S., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitamura, K., Sugaya, N., Usui, T., Murata, T., Maeda, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2004). Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* **431**, blz. 703-7

24. 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

25. Integrale versie van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2003).

26. de Wit, E., Spronken, M. I., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D., and Fouchier, R. A. (2004). Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res* **103**, blz. 155-61

27. World Health Organization (WHO), Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment. (2003), no. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.5

28. Subbarao, K., Chen, H., Swayne, D., Mingay, L., Fodor, E., Brownlee, G., Xu, X., Lu, X., Katz, J., Cox, N., and Matsuoka, Y. (2003). Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* **305**, blz. 192-200

29. Taubenberger, J. K. (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, blz. 9713-5

30. Wood, J. M. and Robertson, J. S. (2004). From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* **2**, blz. 842-7

31. WHO interim recommendations for the protection of persons involved in the mass slaughter of animals potentially infected with highly pathogenic avian influenza viruses, Internet: www.wpro.who.int/avian/docs/recommendations.asp (26 January 2004)
32. Ilyushina, N. A., Rudneva, I. A., Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., and Bovin, N. V. (2004). Receptor specificity of H5 influenza virus escape mutants. *Virus Res* **100**, blz. 237-41
33. Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., Ortin, J., Garcia-Sastre, A., and Nieto, A. (2003). Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**, blz. 6007-13
34. Romanova, J., Katinger, D., Ferko, B., Voglauer, R., Mochalova, L., Bovin, N., Lim, W., Katinger, H., and Egorov, A. (2003). Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology* **307**, blz. 90-7