

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

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

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 04-066/01.co1	10 februari 2006	CGM/060224-01	24 februari 2006
Onderwerp			
Advies IG 04-066/01			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 04-066/01, getiteld 'Pandemic Preparedness Human Influenza H5N1', van Nobilon International B.V., en het voorstel tot inschaling van het Bureau GGO, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot wijziging van de bestaande vergunning IG 04-066. De aanvrager is van plan laboratoriumhandelingen uit te voeren met recombinante influenza A virussen die gebaseerd zijn op de laboratoriumstam A/PR/8/34 en de HA en NA- genen van hoogpathogene influenza A virussen. Doel van het onderzoek is vaccinontwikkeling tegen het H5N1 influenzavirus. De aanvrager verzoekt om de experimenten omlaag te schalen naar ML-II inperkingsniveau en één van de aanvullende voorschriften, het dragen van een mond- en neuskapje én een beschermende bril, te laten vervallen.

De COGEM is van mening dat, conform haar eerdere advies (CGM/050201-01), de beoogde experimenten op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden. Bij het werken in een veiligheidskabinet valt niet volledig uit te sluiten dat laboratoriummedewerkers door spatten of aërosolvorming besmet raken met het recombinante influenzavirus. Vaccinaties kunnen niet garanderen dat medewerkers vrij zijn van Influenza A virussen. Hierdoor ontstaat een geringe kans dat de HA en NA genen van het recombinante vaccinvirus gecombineerd worden met genoomsegmenten van andere influenzavirussen. Ook zal het gebruikte vaccin niet gericht zijn tegen H5N1 en kan de medewerker het recombinante virus overdragen aan anderen. De COGEM acht het niet aannemelijk dat dit nieuwe ontstane virus een sterk verhoogde pathogeniteit heeft. Het valt echter niet uit te sluiten dat het replicatievermogen en daarmee het transmissievermogen van een dergelijk virus toeneemt waardoor de kans op het ontstaan van mutanten met ongewenste eigenschappen wordt verhoogd. Om het risico van verspreiding te minimaliseren is de COGEM daarom van mening dat het voorschrift voor het dragen van een mond- en neuskapje én een beschermende bril gehandhaafd moet blijven.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. R.C. Zwart

Vaccinontwikkeling voor humane influenza type H5N1

COGEM advies: CGM/060224-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot wijziging van de bestaande vergunning GGO 04-066, getiteld "Pandemic Preparedness Human Influenza H5N1". De aanvrager is voornemens laboratoriumhandelingen uit te voeren met genetisch gemodificeerde influenza A virussen die gebaseerd zijn op de laboratoriumstam A/PR/8/34. De aanvrager verzoekt om de experimenten die destijds zijn ingeschaald op ML-III inperkingsniveau omlaag te schalen naar ML-II inperkingsniveau met een beperkt aantal aanvullende voorschriften. Daarbij verzoekt de aanvrager om geen mond- en neuskapje en geen beschermende bril te dragen.

Het onderzoek staat in het teken van vaccinontwikkeling tegen het H5N1 influenzavirus in zoogdiercellen en kippeneieren. Het uiteindelijke influenzavirus vaccin dat gebruikt zal worden om mensen te vaccineren, zal geïnactiveerd worden waardoor het virus niet langer infectieus is.

Influenza A virussen

Het influenzavirus of griepvirus is een RNA-virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het griepvirus wordt onderverdeeld in drie typen, te weten Influenza A, B en C (7; 17). In tegenstelling tot Influenza B en C-virussen kunnen alleen Influenza A virussen, naast mensen, ook vogels en andere zoogdieren infecteren.

Het genoom van het *Influenza A virus* is opgebouwd uit acht unieke gensegmenten die coderen voor tien eiwitten. Met name het haemagglutinine (HA) en het neuraminidase (NA) eiwit spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit van het influenzavirus en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (1).

Het HA eiwit bezit een specifieke klievingplaats. Alleen wanneer het HA eiwit in HA1 en HA2 wordt gekliefd is het virus infectieus. De cellulaire protease nodig voor deze klieving is voornamelijk actief in epitheelcellen van de luchtwegen, waardoor deze cellen vatbaar zijn voor het virus.

Vogels die geïnfecteerd zijn met Influenza A virussen (aviaire influenza A) vertonen doorgaans asymptomatische of milde infecties. Echter, laagpathogene virusstammen kunnen door mutaties in het genoom of door uitwisselen van genoomsegmenten, bijvoorbeeld bij virusoverdracht van wilde watervogels naar pluimvee, evolueren tot hoogpathogene virussen (9).

Een verandering van enkele aminozuren in een serie basische aminozuren in de HA klievingplaats kan er toe leiden dat ook andere proteasen in staat zijn het HA eiwit te

klieven. Hierdoor verandert het weefsel tropisme en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit (9; 16).

Daarbij is een influenzavirus, zoals eerder genoemd, opgebouwd uit acht verschillende genoomsegmenten. Bij uitwisseling van deze segmenten tussen twee typen influenzavirussen kunnen theoretisch gesproken 256 unieke combinaties worden gevormd (9). 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 influenzavirus dat wel pathogeen is voor de mens.

Classificatie en naamgeving van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. Voor het *Influenza A virus* zijn in totaal 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend (1; 9; 13). 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 (4). Het subtype dat momenteel veelvuldig het nieuws haalt is het subtype H5N1.

H5N1 virusuitbraken

Tot voor enkele jaren werd aangenomen dat het aviaire *Influenza A virus* geen infectie kan veroorzaken bij de mens. Echter, in 1997 werd in Hong Kong vastgesteld dat het subtype H5N1 van vogels rechtstreeks naar mensen overdraagbaar is (10; 12). Tijdens uitbraken in Azië, in hetzelfde jaar, van dit hoogpathogene influenzavirus raakten achttien mensen besmet waarvan zes aan de gevolgen overleden (5).

In 2003 vonden in Zuidoost Azië wederom uitbraken met hoogpathogene aviaire influenzavirussen (H5N1) plaats, waarbij tot op heden 86 van de 156 besmette mensen zijn overleden (WHO, 16 februari 2006). Blevেন de uitbraken tot eind vorig jaar beperkt tot Zuidoost Azië, sinds kort heeft de ziekte zich uitgestrekt tot Afrika en Europa. Recentelijk is het hoogpathogene subtype H5N1 waargenomen in achtereenvolgens Rusland, Turkije, Roemenië, Kroatië, Irak en het Afrikaanse land Nigeria. In Turkije zijn van de twaalf geïnfecteerde personen er vier aan de gevolgen van de vogelgriep overleden (WHO, 16 februari 2006). Sinds februari van dit jaar is het betreffende virus ook geconstateerd in een aantal lidstaten van de Europese Unie (EU), waaronder Italië, Oostenrijk en Duitsland.

Verspreiding van het aviaire influenzavirus vindt plaats door intensief contact met besmet pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en geïnfecteerde (trek)vogels en via kleine stofdeeltjes door de lucht (4; 9; 13). Hoewel duidelijk is dat mensen geïnfecteerd kunnen raken met het H5N1 influenzavirus, zijn er tot op heden nog geen aanwijzingen dat deze verspreiding efficiënt is. Mocht hierin verandering optreden

dan is de verwachting dat niet alleen jonge kinderen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem ziek worden, maar ook gezonde volwassenen geïnfecteerd zullen raken. Omdat onder het grootste deel van de bevolking weinig immuniteit tegen het H5 eiwit heerst, zou een wereldwijde pandemie het gevolg kunnen zijn (9; 13).

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 (2). 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 (6).

De COGEM heeft vorig jaar over een aanvraag geadviseerd (CGM/050201-01), waarbij onder andere recombinante virussen geproduceerd worden op basis van het geattenuerde influenzavirustype A/PR/8/34 (H1N1) (3). De chimere influenzavirussen zijn samengesteld uit zes of zeven gensegmenten van de geattenuerde stam en één of twee gensegmenten van andere influenzavirussen. De aanvrager heeft destijds aangegeven dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat en dat in de heterologe gensegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht zijn.

De COGEM heeft geadviseerd om de productie van de recombinante influenza A virussen, de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en de handelingen met cellen en weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uit te voeren met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- de medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *Influenza A virus*;
- de medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- 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 (18) én beschermende bril is verplicht.

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

- 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.

Adviesvraag

De aanvrager is voornemens experimenten uit te voeren met genetisch gemodificeerde influenza A virussen (NIBRG-12 en NIBRG-14) die gebaseerd zijn op influenza A vaccinstam A/PR/8/3. De betreffende influenzavirussen zijn vervaardigd in referentielaboratoria van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO). De vaccinstammen die gebruikt worden zijn samengesteld uit zes individuele genoomsegmenten afkomstig van de influenza A vaccinstam A/PR/8/34. De overige twee genoomsegmenten coderen voor het HA en NA eiwit, welke afkomstig zijn van hoogpathogene H5N1 influenza A virussen (A/HongKong/213/03 en A/Vietnam/1194/04).

De aanvrager verzoekt om een omlaagschaling naar ML-II inperkingsniveau met aanvullende voorschriften zoals vermeld in COGEM advies CGM/050201-01 (3). Daarbij dient de aanvrager een verzoek in om het aanvullend voorschrift “het dragen van een mond- en neuskapje (N-95 of hogere specificatie) én een beschermende bril” te laten vervallen.

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 of de experimenten op een lager inperkingsniveau (ML-II) uitgevoerd mogen worden zonder eerder genoemd aanvullend voorschrift.

Overwegingen en advies

De chimere influenzavirussen zijn gebaseerd op de virusstam A/PR/8/34. Van deze vaccinstam is mede op grond van literatuurgegevens bekend dat deze avirulent en sterk geattenuëerd is voor mensen (15; 16; 19; 20). Eerdere experimenten hebben aangetoond dat recombinante virussen, die bestaan uit zes genoomsegmenten van A/PR/8/34 en twee genoomsegmenten van het HA en NA van andere wildtype humaan influenza virussen, niet virulent zijn voor mensen (20).

In de recombinante virussen worden de HA en NA genoomsegmenten van H5N1 virusstammen gebruikt. Verwijdering van de basische klievingplaats in het HA eiwit van het H5N1 influenzavirus zal de pathogeniteit voor mensen drastisch verminderen (5).

De Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) heeft aangegeven dat recombinante virussen, bestaande uit zes genoomsegmenten van A/PR/8/34, het NA gen van het H5N1 virus en het HA gen zonder de basische aminozuren van het H5N1 virus, niet pathogeen zijn. De WHO merkt hierbij echter op dat er een geringe kans bestaat dat indien uitwisseling van genoomsegmenten optreedt tussen een recombinante influenzavirus en ‘normale’ humane influenzavirussen dit kan leiden tot een humaan replicatiecompetent virus. In een uitzonderlijke situatie kan uitwisselen van

genoomsegmenten leiden tot een volledig aan de mens aangepast virus en resulteren in een pandemie (19; 20).

De COGEM is van mening dat de kans minimaal is dat, door het uitwisselen van maximaal twee genoomsegmenten van de geattenueerde virusstammen A/PR/8/34, recombinante virussen ontstaan met veranderingen in transmissie, pathogeniteit, en fitness in vergelijking met de A/PR/8/34 virusstam. Daarom kunnen conform het eerdere COGEM advies (CGM/050201-01) de door de aanvrager beoogde werkzaamheden met influenzavirussen, volgens de COGEM op ML-II inperkingniveau met aanvullende voorschriften uitgevoerd worden (3).

In de aanvullende voorschriften die eerder door de COGEM zijn opgesteld, wordt onder andere gesteld dat het dragen van een mond- en neuskapje (N-95 of hogere specificatie) én een beschermende bril verplicht is (3). De verspreiding van influenzavirussen vindt plaats door direct en indirect contact en door aërosolen (4; 9; 13). De ogen zijn een van de meest gevoelige organen voor influenzavirusinfecties bij de mens, aangezien receptoren voor aviaire influenza virussen veelvuldig voorkomen in het epitheel van het oog (8; 11). Bovendien is de werking van het immuunsysteem in de ogen anders dan gebruikelijk ('immune privileged'), waardoor ooginfecties via de traanbuis gemakkelijk door kunnen dringen tot de neus en keelholte (14).

Bij open werkzaamheden in een veiligheidskabinet van klasse II is het niet volledig uit te sluiten dat er geen recombinant influenzavirus door spatten of aërosolen in de werkruimte komt. Daarbij is besmetting van de ogen via direct of indirect contact van de laboratoriummedewerker volgens de COGEM niet ondenkbaar.

Hoewel de medewerker gevaccineerd is tegen humaan *Influenza A* kan niet met absolute zekerheid worden gesteld dat de medewerker geen influenzavirus bij zich draagt. Daarbij zal het gebruikte vaccin niet gericht zijn tegen H5N1 en is er in principe geen immuniteit tegen het recombinante virus. Uitgaande van een 'worst case scenario' betekent dit dat uitwisseling van genoomsegmenten tussen het recombinante en 'normaal' humane virus kan plaatsvinden. Deze uitwisseling kan resulteren in een pathogeen humaan virus. De besmette medewerker kan als infectiebron dienen voor zijn omgeving. Hierbij kan de laboratoriummedewerker, het recombinant virus ook min of meer passief, meenemen en overdragen op andere personen in hun omgeving die geïnfecteerd kunnen zijn met een influenzavirus (9). Ook hier geldt dat de HA en NA genen van het recombinante vaccinvirus gecombineerd kunnen worden met de overige genoomsegmenten van de andere influenzavirussen.

De COGEM acht het niet aannemelijk dat dit nieuwe ontstane virus een sterk verhoogde pathogeniteit heeft. Het valt echter niet uit te sluiten dat het replicatievermogen en daarmee het transmissievermogen van een dergelijk virus toeneemt waardoor de kans op het ontstaan van mutanten met ongewenste eigenschappen wordt verhoogd.

Gezien bovenstaande overwegingen is het niet volledig uit te sluiten dat een nieuw recombinant influenzavirus kan ontstaan dat van mens op mens kan verspreiden en eventueel een pandemie kan veroorzaken (9; 13).

Teneinde de mogelijke transmissie via slijmvliezen van ogen, neus en keelholte van de laboratoriumwerker te reduceren, adviseert de COGEM derhalve om het aanvullende voorschrift te handhaven waarin gesteld wordt dat "het dragen van een mond- en neuskapje (N-95 of hogere specificatie) én een beschermende bril verplicht is".

Conclusie

De COGEM is van mening dat de aangevraagde werkzaamheden, waaronder infectie van animale cellen en geëmbryoneerde kippeneieren, met recombinante influenzavirussen die gebaseerd zijn op influenza A vaccinstam A/PR/8/3 op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- de medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *Influenza A virus*;
- de medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- open 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 (18) én beschermende bril is verplicht;
- heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd;
- voor heterologe HA-coderende gensegmenten geldt dat de aanwezigheid van een basische klievingsplaats is uitgesloten.

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.

Met inachtneming van de inperkingsmaatregelen en de hierboven genoemde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, bij het uitvoeren van de eerder genoemde experimenten, verwaarloosbaar klein zijn

Referenties

1. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, blz. 196-209
2. COGEM advies CGM/040326-03, Influenza A virussen.
3. COGEM advies CGM/050201-01, Onderzoek naar Influenza virus.
4. 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.
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. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
8. Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A., and Bosman, A. (2004). Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* **363**, blz. 587-93
9. Lewis, D. B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* **57**, blz. 139-54
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. Olofsson, S., Kumlin, U., Dimock, K., and Arnberg, N. (2005). Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? *Lancet Infect Dis* **5**, blz. 184-8
12. Palese, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nat Med* **10**, blz. S82-7
13. Riedel, S. (2006). Crossing the species barrier: the threat of an avian influenza pandemic. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **19**, blz. 16-20
14. Streilein, J. W., Wilbanks, G. A., and Cousins, S. W. (1992). Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J Neuroimmunol* **39**, blz. 185-200
15. 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
16. 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
17. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
18. WHO interim recommendations for the protection of persons involved in the mass slaughter of animals potentially infected with highly pathogenic avian influenza viruses (26 January 2004)
19. 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

20. 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