

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 16 februari 2022
KENMERK CGM/220216-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden recombinant influenza A

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 22-004_2.8-000 getiteld 'Inschaling van recombinant reassorted H3N2-Port Chalmers (PC1) werk op MLII niveau', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

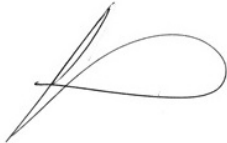
De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) Influenza A virus (FLUAV) -stam A/Port-Chalmers/1/73 (PC1). Twee genoomsegmenten, coderend voor de HA en NA-eiwitten, zullen worden vervangen door die van een ander FLUAV (zogenoemde '6:2 reassortanten'). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij aanvullende voorwaarden in acht worden genomen.

Het vermogen van influenzavirussen om ernstige ziekte te veroorzaken in vogels, wordt grotendeels bepaald door de aanwezigheid van een polybasische klievingsplaats in het HA-eiwit. De COGEM heeft eerder geadviseerd dat werkzaamheden met 6:2 reassortanten met laagpathogene influenza A virusstammen, waarbij er geen polybasische klievingsplaats aanwezig is, op ML-II kunnen plaatsvinden. Tevens heeft de COGEM eerder geoordeeld dat de A/Port-Chalmers/1/73 stam laagpathogeen is. De gegenereerde 6:2 reassortanten zullen geen polybasische klievingsplaats bevatten.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-II, onder navolging van de gestelde voorwaarden en voorschriften, 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,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG
 Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Advies inschaling werkzaamheden met gg-Influenza A virus H3N2 A/Port-Chalmers/1/73 (6:2 reassortant)

COGEM advies CGM/220216-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met recombinante genetisch gemodificeerde (gg-) Influenza A/Port-Chalmers/1/73 (PC1) virussen op inperkingsniveau ML-II (IG 22-004). De aanvraag is afkomstig van Intervet B.V. De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met H3N2 A/Port-Chalmers/1/73 reassortanten, waarbij 6 genoomsegmenten afkomstig zijn van A/Port-Chalmers/1/73 en 2 heterologe genoomsegmenten, die coderen voor hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA), afkomstig zijn van verschillende influenza A virussen; dit kan alle influenzavirussen betreffen, met uitzondering van de 1918 H1N1 virusstam. Er wordt verzocht de werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

2. Influenza A virus

Influenza A virus (FLUAV) behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en het genus *Alphainfluenzavirus*.¹ Het RNA-genoom van *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten. Deze coderen voor de virale eiwitten PB1, PB2 en PA (deze drie eiwitten vormen het RNA-polymerase), een nucleoproteïne (NP), de matrixeiwitten M1 en M2, haemagglutinine (HA), neuraminidase (NA), en voor de niet-structurele eiwitten NS1 en NEP ('nuclear-export protein', voorheen bekend als NS2).^{2,3}

De HA en NA oppervlakte-eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.^{4,5} Het NA-eiwit speelt een rol bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Het HA-eiwit is verantwoordelijk voor de aanhechting van het virus aan de gastheercel.^{2,5,6} Het HA-eiwit wordt gesynthetiseerd als één enkele polypeptide (HA0). Alvorens een gastheercel geïnfecteerd kan worden door het virus moet HA0 gekleefd worden door cellulaire proteases in de HA1 en HA2 subunits.²

2.1 Aviaire influenzavirussen

Wilde watervogels zijn de natuurlijke reservoirs voor influenza A virussen en vormen, direct en indirect, een bron voor influenza A virussen die andere soorten kunnen infecteren.² Van een beperkt aantal subtypen is aangetoond dat deze incidenteel mensen of andere zoogdieren kunnen infecteren. De meeste aviaire influenzavirussen zijn laagpathogeen en veroorzaken in het algemeen geen tot milde symptomen bij pluimvee en wilde vogels. Bepaalde aviaire influenza A virussen zijn echter hoogpathogeen en veroorzaken een zeer ernstige en besmettelijke ziekte (vogelgriep of vogelpest) bij pluimvee en andere vogelsoorten.^{2,7} Het onderscheid tussen hoogpathogene aviaire influenza (HPAI) en laagpathogene aviaire influenza (LPAI) virussen, is gebaseerd op de aminozuurvolgorde van de proteolytische klievingsplaats van het HA0 eiwit.² Hierbij moet opgemerkt worden dat een voor pluimvee

laagpathogeen virus niet altijd laagpathogeen is voor andere dieren of mensen (bijvoorbeeld: LPAI H7N9 kan ernstige ziekte veroorzaken bij de mens).

2.2 Influenza A virussen bij de mens

Influenza A virussen die bij de mens voorkomen, kunnen onderscheiden worden in aan de mens aangepaste (seizoensgebonden) influenzavirussen die de mens als primaire gastheer hebben, en influenzavirussen die circuleren in dieren en sporadisch mensen infecteren, zoals aviaire influenzavirussen of varkensinfluenzavirussen, waarbij nauwelijks tot geen verdere overdracht tussen mensen optreedt. Tevens is het de afgelopen ~honderd jaar een aantal keren voorgekomen dat een ‘nieuw’ dierlijk of humaan-dierlijk influenza (reassortant) virus in de humane populatie werd geïntroduceerd en een pandemie veroorzaakte.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden betreffen de productie- en infectiewerkzaamheden met gg-FLUAV, waarbij 6 genoomsegmenten afkomstig zijn van de laagpathogene Influenza A/Port-Chalmers/1/73 virusstam, en 2 heterologe genoomsegmenten die coderen voor de NA- en HA-eiwitten afkomstig van andere influenza A virussen, met uitzondering van de 1918 H1N1 stam. De te gebruiken Influenza A/Port-Chalmers/1/73 is meer dan 50 keer gepasseerd op eieren, waardoor deze stam zeer waarschijnlijk extra verzwakt geraakt is in vergelijking tot de oorspronkelijke laagpathogene Influenza A/Port-Chalmers/1/73.⁸ De gg-virussen (6:2 reassortanten) zullen worden vervaardigd door middel van ‘reverse genetics’, waarbij de productiewerkzaamheden zullen worden uitgevoerd in animale cellen. Tevens is de aanvrager voornemens infectiewerkzaamheden in animale cellen en geëmbryoneerde kippeneieren met de geproduceerde gg-PC1 reassortanten uit te voeren.

De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren, onder toepassing van de volgende aanvullende voorschriften:

- Alle handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Medewerkers die symptomen van griep vertonen, zijn uitgesloten van de werkzaamheden;
- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan influenza A virus;
- Het dragen van een beschermende bril is verplicht.

Tevens zal de aanvrager aanvullende voorschriften hanteren voor infectiewerkzaamheden met geëmbryoneerde kippeneieren in associatie met gg-influenza A virussen:

- De geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed;
- De dozen worden uitsluitend in een veiligheidskabinet van klasse II geopend en bij breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Voor de geproduceerde gg-PC1 reassortanten hanteert de aanvrager de volgende voorwaarden:

- De heterologe genoomsegmenten zijn volledig gekarakteriseerd;
- De heterologe HA-coderende genoomsegmenten bevatten geen polybasische klievingsplaats(en)

4. Eerder COGEM advies

In het verleden zijn alle influenza A virussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3⁹, maar in oktober 2020 heeft de COGEM de pathogeniteitsclassificatie van influenza A virussen heroverwogen.¹⁰ Zij heeft toen geadviseerd om alle influenza A virussen omlaag te schalen naar pathogeniteitsklasse 2, met uitzondering van: de hoogpathogene aviaire influenza (HPAI) virussen van de subtypen H5 en H7, omdat zij systemische infecties met ernstige symptomen en hoge mortaliteit bij pluimvee veroorzaken; 1918 H1N1 ‘Spaanse griep’ en 1957 H2N2 ‘Aziatische griep’, omdat er tegen deze pandemische virulente virussen geen afdoende populatie-immuniteit onder de humane populatie bestaat; humaanpathogene laagpathogene aviaire influenza (LPAI) H7N9 virussen, omdat deze aviaire influenzavirussen een ernstig ziektebeeld en hoge mortaliteit bij de mens kunnen veroorzaken; en ‘Nieuwe’ influenza A virussen met een pandemisch potentieel (d.w.z. een dierlijk of humaan-dierlijk influenza (reassortant) virus dat door de WHO opgenomen is in ‘pandemische paraatheidsfase’ 3, 4, 5 of 6). De COGEM heeft geadviseerd deze virulentere virussen te handhaven in pathogeniteitsklasse 3.

In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met de Influenza A/Port-Chalmers/1/73 stam.⁸ Op basis van aanwijzingen in de destijds beschikbare literatuur en de vele passages op eieren, was de COGEM van oordeel dat deze virusstam laagpathogeen is, en de pathogeniteit niet groter zal zijn dan die van wildtype humane veldstammen. Zij was van oordeel dat laboratoriumwerkzaamheden met Influenza A/Port-Chalmers/1/73 uitgevoerd konden worden op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van enkele voorschriften. Hierbij werd echter opgemerkt dat bij het maken van reassortanten, de inschaling en aanvullende maatregelen opnieuw beoordeeld dienen te worden.

Verder heeft de COGEM nog diverse keren geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV 6:2 reassortanten met laagpathogene vaccinstammen, zoals influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR) of A/WSN/33 (H1N1) als uitgangsvirus.^{11,12,13} De PR en WSN stammen zijn als avirulent en sterk geattenuerd voor mensen aangemerkt, en de COGEM oordeelde dat reassortanten bestaande uit 6 genoomsegmenten van PR of WNS, en 2 genoomsegmenten (HA en NA) van een wildtype humaan influenza virus (waarbij geen polybasische klievingsplaats in HA aanwezig is), niet virulent zijn voor mensen en dat werkzaamheden kunnen worden uitgevoerd op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van aanvullende voorschriften.

Specifiek voor werkzaamheden met kippeneieren heeft de COGEM daar in het verleden de volgende voorschriften aan toegevoegd:

- 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.

In het advies over de heroverweging van de pathogeniteitsclassificatie van Influenza A virussen¹⁰ zijn voor werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II met gg-influenza A virussen die samengesteld zijn uit klasse 2 ingedeelde influenza A virussen, de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Voor heterologe HA-coderende genoomsegmenten moet een polybasische klievingsplaats in het geproduceerde eiwit uitgesloten zijn;
- Met sequentie-analyse moet vastgesteld zijn dat de genoomsegmenten afkomstig zijn van klasse 2 ingedeelde influenza A virussen;
- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf zijn gevaccineerd tegen de actueel circulerende humane FLUAV stammen.

In een daaropvolgend vervolgadvisie is aangegeven dat de COGEM van oordeel is dat werkzaamheden met reassortanten van laagpathogene vaccinstammen (zoals A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) met een haemagglutinine (HA) van een HPAI virus waarin de polybasische klievingsplaats is verwijderd, generiek op ML-II kunnen worden ingeschaald met de aanvullende maatregelen zoals hierboven genoemd.¹⁴

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met A/Port-Chalmers/1/73 6:2 reassortanten op inperkingsniveau ML-II. De aanvrager hanteert hierbij als voorwaarden dat het HA geen polybasische klievingsplaats bevat en de heterologe genoomsegmenten geen ongedefinieerde mutaties bevatten.

In 2006 heeft de COGEM A/Port-Chalmers/1/73 als laagpathogeen virus beschouwd, maar werd opgemerkt dat indien reverse genetics gebruikt worden voor het veranderen van virussen (zoals reassortments), de inschaling en de aanvullende maatregelen opnieuw beoordeeld dienen te worden. In een later advies (2021)¹⁴ heeft de COGEM geoordeeld dat werkzaamheden met reassortanten van laagpathogene vaccinstammen (zoals A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) met een HA van een HPAI virus waarin de polybasische klievingsplaats is verwijderd, generiek op ML-II kunnen worden ingeschaald wanneer aanvullende voorwaarden in acht worden genomen.¹⁴

De COGEM is op basis van de beschikbare literatuur nog steeds van oordeel dat A/Port-Chalmers/1/73 een laagpathogene influenza A stam is,^{15,16} die gebruikt wordt in veterinaire influenzavaccins.¹⁷ De virulentie van A/Port-Chalmers/1/73 is vergelijkbaar met die van het A/Puerto Rico/8/34 influenzavirus. De COGEM is van oordeel dat uitwisseling van HA en NA genoomsegmenten van een ander influenzavirus (waarbij géén (poly)basische klievingsplaats in HA aanwezig is), geen invloed heeft op het laagpathogene fenotype van de influenza A stam A/Port-Chalmers/1/73.

Alles in ogenschouw nemende, stemt de COGEM in met de inschaling van werkzaamheden met 6:2 reassortanten gebaseerd op A/Port-Chalmers/1/73 op inperkingsniveau ML-II, onder toepassing van

de voorgestelde aanvullende inperkingsmaatregelen, zoals in haar eerdere advies (2020)¹⁰ is geadviseerd:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Medewerkers die symptomen van griep vertonen, zijn uitgesloten van de werkzaamheden;
- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan influenza A virus of dragen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2)

Hierbij geldt voor infectiewerkzaamheden met geëmbryoneerde kippeneieren dat:

- De geïnfecteerde eieren in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof worden bebroed;
- De dozen uitsluitend in een veiligheidskabinet van klasse II geopend worden en bij breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Samenvattend, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II, onder navolging van de gestelde voorwaarden en voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 8 februari 2022)
2. Wright PF *et al.* (2013). Chapter 41 Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
3. McCauley JW *et al.* (2012). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses. Family *Orthomyxoviridae*. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
4. Shaw ML & Palese P (2013). Chapter 40 *Orthomyxoviridae*. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
5. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed. Pharmacother. 54: 196-209
6. Long JS *et al.* (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. Nat. Rev. Microbiol. 17: 67-81
7. Avian influenza <http://www.fao.org/avianflu/en/qanda.html#4> (bezocht: 8 februari 2022)
8. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem. COGEM advies CGM/060724-03
9. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advise CGM/040326-03
10. COGEM (2020). Heroverweging pathogeniteitsclassificatie influenza A virussen. COGEM advies CGM/201006-02

11. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
12. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
13. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advies CGM/100830-02
14. COGEM (2021). Vervolgadvies heroverweging pathogeniteitsclassificatie Influenza A virussen. COGEM advies CGM/210618-01
15. Campitelli L *et al.* (2002). H3N2 influenza viruses from domestic chickens in Italy: an increasing role for chickens in the ecology of influenza? *J. Gen Virol.* 83: 413-420.
16. Bender B *Set al.* (1992). Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. *J. Exp. Med.* 175: 1143-1145
17. De Vleeschauwer A *et al.* (2015). Vaccination-challenge studies with a Port Chalmers/73 (H3N2)-based swine influenza virus vaccine: reflections on vaccine strain updates and on the vaccine potency test. *Vaccine* 33: 2360-2366