

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 24 juli 2006
KENMERK CGM/060724-03
ONDERWERP Advies ontwikkeling van influenza virus m.b.v. een reverse genetics systeem (IG 06-041)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld "Ontwikkeling van een reverse genetics systeem voor influenza virus type H3N2" van Intervet te Boxmeer, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van handelingen met het H3N2 influenza A virus A/Port Chalmers/1/73 (PC1). De aanvrager wil met behulp van 'reverse genetics' virus regenereren van gekloneerde fragmenten. Hiertoe worden acht genomsegmenten van PC1 gekloneerd in acht plasmiden, waarna co-transfectie plaatsvindt in humane cellen. In deze cellen treedt regeneratie van het virus op. In dierproeven, zoals muis, rat en varken, wordt vervolgens het fenotype van dit virus bestudeerd. Het doel van deze werkzaamheden is het verkrijgen van ervaring met de techniek 'reverse genetics'.

De COGEM is van mening dat het geregenereerde PC1 virus een genetisch gemodificeerd organisme is dat gelijk is aan het originele PC1 virus. Verder is zij van mening dat het gehanteerde PC1 virus laagpathogeen is. Mede hierdoor acht de COGEM het uitvoeren van laboratoriumhandelingen op inperkingsniveau ML-II gerechtvaardigd.

Handelingen met kleine proefdieren kunnen naar de mening van de COGEM uitgevoerd worden op DM-II niveau wanneer de dieren gehuisvest worden in isolatoren of filtertopkooien. Aangezien grote proefdieren niet op een dergelijke wijze gehuisvest kunnen worden, adviseert de COGEM om handelingen met deze dieren uit te voeren op DM-III niveau.

Met in acht name van aanvullende maatregelen, zoals onder andere het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu in deze situatie verwaarloosbaar klein zijn. Verder benadrukt zij dat de inschaling heroverwogen moet worden wanneer het PC1 virus genetisch gemodificeerd wordt.

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 initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem

COGEM advies CGM/060724-03

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van laboratoriumhandelingen en dierproeven met een influenza A virus (H3N2). De aanvrager wil met behulp van 'reverse genetics' virus regenereren van gekloneerde fragmenten. Hiertoe worden acht genoomsegmenten van het virus A/Port Chalmers/1/73 (PC1) gekloneerd in acht plasmiden, waarna co-transfectie plaatsvindt in humane-embryo-nier cellen. In deze cellen vindt regeneratie van het virus plaats. Dit geregenereerde virus wordt vervolgens gekweekt in geëmbryoneerde kippeneieren of op een geschikte cellijn. In dierproeven (muis, rat, fret, kip, kalkoen of varken) zal het fenotype van het virus bestudeerd worden. Het doel van deze werkzaamheden is het verkrijgen van ervaring met de techniek 'reverse genetics'. In vervolgstudies wil de aanvrager onder meer genoomsegmenten van het virus vervangen of modificeren, zodat dergelijke virussen uiteindelijk geschikt kunnen zijn als varkensvaccin. Dit maakt echter nog geen deel uit van de onderhavige aanvraag.

De aanvrager wil de beschreven laboratoriumhandelingen uitvoeren op inperkingsniveau ML-II. Daarnaast is hij voornemens om dierproeven met kleine dieren uit te voeren in een DM-II verblijf en proeven met grote dieren, zoals varkens, in een DM-III ruimte.

Influenza A virussen

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus en wordt van persoon tot persoon overgedragen door hoesten of niezen. Het is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, Influenza A, B en C (1;2). Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). De HA en NA eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (3).

Classificatie van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus* 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor, terwijl bij de mens voor zover bekend H1, H2, H3,

N1, N2 voorkomen. Recentelijk blijkt dat ook H5, H7 en H9 bij de mens tot infecties kunnen leiden (4;5).

De aanvrager maakt in zijn werkzaamheden gebruik van het PC1 H3N2 influenza A virus. Het virus is in 1973 geïsoleerd tijdens een griepuitbraak onder de bevolking van een dorpje in Nieuw-Zeeland. Het virus is daarnaast ook in staat om varkens te infecteren (6). Sinds 1968 circuleren verschillende H3N2 stammen wereldwijd onder de bevolking. Deze stammen veroorzaakten 90% van de griepuitbraken in de jaren negentig. Verder zijn H3N2 virussen de oorzaak van vele influenzageassocieerde ziekenhuisopnames (7).

Geïnactiveerde H3N2 virusstammen zijn al jaren aanwezig in griepvaccins (8). Echter, PC1 is slechts in de jaren zeventig toegepast in geïnactiveerde griepvaccins (9). De PC1 stam wordt nog wel gebruikt in veterinaire griepvaccins (10;11).

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, aangezien influenza A virussen in staat zijn om op een relatief eenvoudige manier te adapteren tot hoogpathogene stammen én omdat 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 (12).

Verder heeft de COGEM in 2004 ook geadviseerd (CGM/040326-03) dat werkzaamheden waarbij hoog- en laagpathogene recombinante influenza A virussen, die via 'reverse genetics' verkregen zijn, dienen plaats te vinden op ML-III niveau. Handelingen met deze virussen in associatie met proefdieren (kippen, eenden en varkens), dienen op DM-III niveau uitgevoerd te worden (13).

De COGEM heeft vorig jaar over een aanvraag geadviseerd (CGM/050201-01), waarbij onder andere recombinante virussen geproduceerd werden op basis van het geattenueerde influenzavirustype A/PR/8/34 (H1N1) (14). Het betrof de vervaardiging van recombinante virussen bestaande uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam, zoals A/PuertoRico/8/34 (H1N1), in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen. De aanvrager heeft destijds aangegeven dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat

en dat in de heterologe genoomsegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht zijn.

De COGEM heeft geadviseerd om de productie van recombinante influenza A virussen, de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en de handelingen met cellen en weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen 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;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen is verplicht;
- het dragen van een mondkapje (model N95 of hogere specificatie) en een beschermende bril is verplicht.

Adviesvraag

Het doel van deze werkzaamheden is het verkrijgen van ervaring met de technologie 'reverse genetics' bij influenzavirussen. In vervolgstudies wil de aanvrager enkele genoomsegmenten van het influenzavirus modificeren of vervangen zodat dergelijke virussen uiteindelijk geschikt zouden kunnen zijn als varkensvaccin. Dit maakt echter geen deel uit van deze vergunningaanvraag.

De geplande werkzaamheden

De PC1 virusstam is verkregen via het ATCC (American Type Culture Collection) en wordt opgekweekt in 'Madin-Darby canine kidney' (MDCK) cellen. Daarna worden de acht afzonderlijke genoomsegmenten van het influenzavirus gekloneerd in acht plasmide vectoren. Na een sequentieanalyse van alle fragmenten en een eventuele correctie van fouten die gedurende het proces ontstaan zijn, worden HEK293 cellen getransfecteerd met de acht plasmiden. In de cellen vindt vervolgens regeneratie van het virus plaatst. Dit proces staat bekend onder de naam 'reverse genetics'.

MDCK cellen zijn volgens GMP-richtlijnen getest op steriliteit en op afwezigheid van ongewenste agentia zoals mycoplasma en een grote reeks van virussen.

De aanvrager wil de bovenstaande experimenten uitvoeren op ML-II niveau.

Na regeneratie van PC1 in HEK293 cellen, wordt bepaald in hoeverre het geproduceerde virus overeenkomt met het oorspronkelijke wildtype PC1 door het bestuderen van de replicatie en pathogeniteit in proefdieren. Hiertoe wordt het gegenereerde virus in geëmbryoneerde kippeneieren (SPF-status) of op de daarvoor geschikte cellijn verder gekweekt en aan verschillende proefdieren (muis, rat, fret, kip, kalkoen of varken)

toegediend. Dit zal gebeuren via de luchtwegen middels het druppelen of vernevelen in de neus- en/of keelholte. In de daarop volgende dagen worden de dieren geobserveerd voor klinische verschijnselen en zullen regelmatig swab-monsters worden genomen van neus- en keelholte die op monolayers van MDKC cellen getitreerd worden. Ook zullen bloedmonsters genomen worden voor serologie. Deze monsters worden gedurende 30 minuten verhit bij 60°C zodat eventueel aanwezig infectieus virus geïnactiveerd wordt. In sommige gevallen zal sectie worden verricht op long- en luchtpijpweefsel. De weefselmonsters worden direct in een 4% formaline oplossing gefixeerd.

Op dit moment worden de proefdieren niet allemaal standaard getest op afwezigheid van influenza virus voor aanvang van de experimenten. De aanvrager merkt op dat de detectie van influenzavirussen in geval van SPF-dieren, met name kippen, onderdeel van de kwaliteitscontrole van de leverancier uitmaakt.

De aanvrager geeft aan experimenten met kleine proefdieren te willen uitvoeren op DM-II niveau waarbij de dieren gehuisvest zijn in onderdrukisolatoren. Hierbij worden muizen en ratten gehuisvest in standaard open kooien welke geplaatst zijn in onderdrukisolatoren. Aangezien grote proefdieren niet in isolatoren geplaatst kunnen worden, stelt de aanvrager voor deze te huisvesten op DM-III.

Transport van ggo's tussen ML-II en DM-II/III ruimtes, vindt plaats in gesloten containers, die voor het verlaten van de ingeperkte ruimte met een desinfectans worden gereinigd (bacillol, 70% ethanol of VikonS).

Aanvullende voorschriften

De aanvrager geeft verder aan aanvullende maatregelen te hanteren. De voorschriften die hij heeft opgesteld voor handelingen op ML-II niveau zijn deels in overeenstemming met de door de COGEM gestelde aanvullende voorschriften in het advies CGM/050201-01 (14). Aanvullingen hierop zijn:

- Luchtafvoer is voorzien van HEPA-filters welke jaarlijks gecontroleerd worden;
- Handhaving van onderdruk in laboratoria waar met virus gewerkt wordt en in opslagruimtes;
- Incubatie van geïnfecteerde eieren in gesloten vloeistofdichte dozen die worden uitsluitend in een klasse II veiligheidskabinet geopend. Bij breuk wordt alles geautoclaveerd.

In tegenstelling tot de aanvullende voorschriften die door de COGEM zijn opgesteld voor werkzaamheden met influenzavirussen, acht de aanvrager het dragen van mondkapjes en brillen bij het uitvoeren van open werkzaamheden in een klasse II veiligheidskabinet niet noodzakelijk.

Voor de werkzaamheden in de DM-II diervverblijven, stelt de aanvrager dat het dragen van mondkapjes, brillen of persluchtmaskers overbodig is aangezien er een volledige inperking heerst binnen de onderdruk-isolatoren.

Handelingen met grote proefdieren in associatie met ggo's brengen, volgens de aanvrager, een groter risico met zich mee omdat direct contact met het dier onvermijdelijk is. Daarom acht hij het dragen van een mondkapje (model N95) en beschermende bril, of persluchtmasker, noodzakelijk.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van de beschreven werkzaamheden.

Overweging en advies

Aan de beschreven handelingen zouden risico's verbonden kunnen zijn indien het virus hoogpathogeen is en vrijkomt uit de inperking. Om dit risico te kunnen inschatten, worden de pathogeniteit alsmede de inperkende maatregelen beoordeeld.

Pathogeniteit van PC1

De beschreven werkzaamheden betreffen onder andere het 'reverse genetics' systeem waarmee het PC1 virus geregenereerd wordt uit de afzonderlijke gekloneerde genoomsegmenten van het originele PC1. Deze genoomsegmenten worden na klonering gesequenced en vergeleken met het originele virus. Eventuele verschillen, ontstaan als gevolg van de procedure, worden hersteld. Naar de mening van de COGEM vormt het geproduceerde PC1 virus een ggo dat beschouwd kan worden als een equivalent van het uitgangsvirus. De COGEM acht de pathogeniteit van het wildtype PC1 daarom ook van toepassing op het geregenereerde PC1 virus.

De aanvrager is van mening dat het PC1 virus laag pathogeen is. Hij geeft aan dat een gedegen onderbouwing niet eenvoudig te overleggen is omdat in de literatuur weinig studies beschreven zijn waaruit het al dan niet virulente karakter eenduidig afgeleid kan worden. In de literatuur lijken wel aanwijzingen te zijn dat PC1 verminderd virulent is. Uit een studie blijkt dat na intraveneuze toediening van PC1 in SPF-kippen geen replicatie optreedt in het ademhalingsstelsel of het maag-darmkanaal (15). Verder lijkt PC1 minder virulent te zijn dan de influenza A stam A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1). Na toediening van PC1 aan muizen met een verstoord β_2 -microglobuline-gen blijkt dat het virus zich niet kan handhaven en bijna volledig verdwenen was uit de longen van dieren. Terwijl uit dezelfde studie blijkt dat het percentage overlevende muizen 15 dagen na toediening van het PR8 virus slechts 10% bedraagt (16).

De aanvrager merkt op dat challenge studies in varkens met H3N2 stammen nauwelijks klinische symptomen veroorzaken. Slechts wanneer een hoge dosis via de luchtpijp toegediend wordt, kunnen ziekteverschijnselen geïnduceerd worden.

Verder is het originele PC1 virus in het laboratorium meer dan 50 maal gepasseerd op eieren. Volgens de COGEM is het zeer waarschijnlijk dat het virus hierdoor verzwakt geraakt is. Het kweken op eieren bevordert de selectie van virusvarianten die optimaal zijn aangepast aan deze kweekomstandigheden. Echter, in eieren ontbreken sommige vormen van selectiedruk (bijvoorbeeld een goed ontwikkeld immuunsysteem) die wel aanwezig zijn in de natuurlijke gastheer. Op deze manier ontstaat een selectie van varianten die zich snel kunnen vermenigvuldigen in het kweekstelsel maar die eigenschappen leidend tot virulentie in de natuurlijke gastheer verloren hebben.

Gezien de aanwijzingen uit de literatuur en het feit dat het PC1 virus vaak gepasseerd is in eieren, verwacht de aanvrager dat de pathogeniteit van het geregenereerde virus lager is dan die van Influenza A stammen die tijdens een griepseizoen worden aangetroffen. Verder stelt de aanvrager dat het laagpathogene karakter van deze stam voor kippenembryo's, het standaard substraat voor grootschalige vaccinbereiding, deze conclusie ondersteunt.

Hoewel de virulentie van het virus voor de mens en relevante diersoorten niet of nauwelijks is onderzocht, is de COGEM van mening dat, gezien het bovenstaande, het gehanteerde PC1 virus laagpathogeen is. De COGEM is van mening dat de virulentie van PC1 voor mensen niet groter zal zijn dan wildtype humane veldstammen. De COGEM heeft in een eerder advies gesteld dat gebleken is dat slechts de influenza subtypes H5 en H7 behoren tot de hoogpathogene virussen (CGM/040326-03). Ook wijst de COGEM er op dat het ATCC het wildtype PC1 virus classificeert als een pathogeen van klasse 2.

Inperkende maatregelen

De beschreven werkzaamheden hebben betrekking op laboratoriumhandelingen en handelingen met proefdieren in associatie met geregenereerd PC1 virus. Hieronder wordt ingegaan op de inperkende maatregelen die voor beide situaties noodzakelijk geacht worden om zodoende de veiligheid van mens en milieu te waarborgen.

Laboratoriumwerkzaamheden kunnen plaatsvinden op ML-II niveau

Laboratoriumhandelingen hebben zowel betrekking op de infectie van animale cellen als op handelingen met monsters van proefdieren die tijdens en na experimenten verzameld zijn. Eventueel aanwezig virus in bloedmonsters afkomstig van geïnfecteerde proefdieren wordt geïnactiveerd door verhitting gedurende 30 minuten bij 60°C. Weefselmateriaal van de longen en de luchtpijp wordt direct gefixeerd in een 4% formaline oplossing. De

experts van de COGEM zijn uit eigen ervaring van mening dat inactivatie van influenza virus in serum door verhitting zeer effectief is. Verder merkt zij op dat formaline een effectieve en veel toegepaste methode is om virussen te inactiveren bij bijvoorbeeld vaccinproductie.

Gezien het laagpathogene karakter van het geproduceerde PC1 virus en omdat het virus gelijk is aan het originele virus, zodat theoretische onverwachte effecten als gevolg van genetische modificaties uitgesloten kunnen worden, is de COGEM van mening dat inperkingsniveau ML-II voldoende inperking biedt om eventuele risico's als gevolg van de handelingen te minimaliseren.

De aanvrager heeft tevens aanvullende voorschriften opgesteld, welke reeds in dit advies beschreven zijn. De COGEM is van mening dat deze voorschriften de kans op eventuele risico's verder minimaliseren. De COGEM heeft in een eerder advies het dragen van bril en mondkapje noodzakelijk geacht omdat bij open werkzaamheden in een veiligheidskabinet van klasse II niet volledig uit te sluiten is dat er geen genetisch gemodificeerd 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. De COGEM acht het dragen van een mond- en neuskapje en een bril in deze situatie echter niet strikt noodzakelijk. Het geregenereerde PC1 is namelijk niet gewijzigd van het originele PC1 en dus laagpathogeen. De kans op een infectie met geproduceerd PC1 virus is zeer klein. Ten hoogste kan dit leiden tot een ziektebeeld dat gelijk is aan het ziektebeeld dat van wildtype laagpathogene griepvirussen. De COGEM adviseert om medewerkers te vaccineren tegen influenza A om de kans op een infectie verder te verkleinen en om eventuele recombinatie tussen wildtype influenzavirussen en het ggo virus te voorkomen. De COGEM merkt op dat de vaccinatie mogelijk geen volledige bescherming biedt. Het subtype van PC1, H3N2, komt overeen met een subtype dat aanwezig is in humane vaccins (8). Ofschoon PC1 waarschijnlijk afwijkt van de huidige vaccinstam, is er toch enige kruisbescherming te verwachten.

De COGEM stemt verder in met de door Bureau GGO opgestelde aanvullende voorschriften.

Alvorens transport plaatsvindt tussen laboratoria en dierverspreiden worden containers met het geregenereerde virus gereinigd met bijvoorbeeld 70% ethanol. De COGEM acht de reinigingsmethode effectief om eventueel aan de buitenzijde aanwezig virus te inactiveren. Het influenzavirus is omgeven door een membraan dat gevoelig is voor de gehanteerde reinigingsmiddelen.

Handelingen met proefdieren vinden plaats in dierverblijven

Het PC1 virus wordt na regeneratie toegediend aan proefdieren om het fenotype te bepalen en te vergelijken met het originele PC1 virus. Eventuele risico's bij handelingen met proefdieren hebben betrekking op de overdrachtswijze en op de aëroge verspreidingswijze, van het influenzavirus naar medewerkers. Om risico's te beperken worden handelingen met proefdieren uitgevoerd in dierverblijven. Kleine proefdieren, bijvoorbeeld muizen, worden op een andere wijze gehuisvest dan grote proefdieren, zoals varkens. Hieronder wordt op beide situaties ingegaan.

- Handeling met kleine proefdieren op DM-II niveau

De aanvrager wil kleine proefdieren huisvesten op DM-II niveau in onderdrukisolatoren. De COGEM is het hiermee eens omdat aëroge overdracht voorkomen wordt. Aangezien PC1 een laagpathogeen virus is dat gelijk is aan het originele PC1 virus, acht de COGEM huisvesting in isolatoren niet strikt noodzakelijk. Bij de beschreven werkzaamheden kan ook volstaan worden met het huisvesten van kleine dieren in filtertopkooien. Open handelingen dienen in dit geval plaats te vinden in een veiligheidskabinet klasse II.

De COGEM stemt in met de aanvullende voorwaarden die zijn opgesteld door Bureau GGO, zoals het vaccineren van medewerkers en het dragen van handschoenen. Echter, de COGEM acht het dragen van een mond- en neuskapje en een bril, in deze situatie niet noodzakelijk omdat de isolator dan wel filtertopkooi en het veiligheidskabinet klasse II voldoende inperking bieden, mede gezien het laagpathogene karakter van het virus.

- Handelingen met grote proefdieren op DM-III niveau

Grote proefdieren kunnen niet gehuisvest worden in isolatoren en vormen daardoor een groter risico op blootstelling voor medewerkers vanwege eventuele virusreproductie in de dieren, mogelijke minimale infectiedosis, aëroge verspreidingswijze van het virus en het directe contact tussen medewerkers en dieren. De COGEM is van mening dat gezien dit risico, dergelijke werkzaamheden dienen plaats te vinden in DM-III dierverblijven.

Gezien het grotere risico dat deze werkzaamheden met zich meebrengen dienen aanvullende voorschriften gehanteerd te worden. Ter bescherming tegen eventuele infecties met het ggo, dienen medewerkers een mond- en neuskapje (model N95) en een beschermende bril te dragen. Daarnaast dienen medewerkers die griepverschijnselen vertonen uitgesloten te worden van de werkzaamheden. Verder acht de

COGEM vaccinatie tegen Influenza A noodzakelijk vanwege het directe contact met de dieren.

Conclusie

De COGEM is van mening dat het geregenereerde PC1 virus een laagpathogeen virus is. Daarom is de COGEM van mening dat laboratoriumwerkzaamheden, in deze situatie, kunnen plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau. Werkzaamheden met kleine proefdieren dienen op DM-II niveau plaats te vinden waarbij de dieren in een isolator dan wel filtertopkooi gehuisvest worden. Werkzaamheden met grote proefdieren dienen in DM-III dierversluiting uitgevoerd te worden omdat huisvesting van deze dieren in filtertopkooien of isolatoren niet mogelijk is.

Met in acht name van de gestelde aanvullende maatregelen, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De COGEM benadrukt dat indien het reverse genetics systeem gebruikt wordt voor het veranderen van virussen (zoals reassortments), de inschaling én de aanvullende maatregelen opnieuw beoordeeld dienen te worden. Het gedrag van dergelijke genetische gemodificeerde virussen is namelijk minder voorspelbaar.

Referenties

1. Knipe, M. D. en Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
2. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego.
3. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 54: 196-209.
4. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., en Skalka, A. M. (2004). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, Washington, D.C.
5. Lewis, D. B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-54.
6. World Health Organization. (2002). *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance*.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Internet: <http://www.cdc.gov/> (14 juli 2006).
8. European Influenza Surveillance Scheme. Influenza vaccinatie. Internet: http://www.eiss.org/html/faq_vaccination_nl.html (17 juli 2006).
9. State of Alaska, Health and Social Services. Internet: http://www.eiss.org/html/faq_vaccination_nl.html (14 juli 2006).
10. De Jong, J.C., Van Nieuwstadt, A.P. *et al.* (1999). Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine* 17: 1321-1328.
11. Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie. Diergeneesmiddelen. Internet:

<http://www.bcfi-vet.be/nl/texts/NSUOOOL1AL2o.lasso> (17 juli 2006).

12. COGEM advies CGM/040326-03. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen.
13. COGEM advies CGM/040518-02. COGEM (2004). Recombinante virussen samengesteld met behulp van 'reverse genetics' uit hoog- en laagpathogene aviaire Influenza A virussen.
14. COGEM advies CGM/050201-01. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinant Influenza A virussen.
15. Campitelli, L. Fabiani, C. *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.S., Croghan, T. *et 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.