

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 15 april 2020
KENMERK CGM/200415-02
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met gg-FLUAV H5N1 delNS1 (4:3:1 reassortant)

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-094_2.8-002 getiteld 'Het onder GMP produceren van vaccinmateriaal ten behoeve van een klinische trial', ingediend door HALIX B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) stam A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Drie gensegmenten, coderend voor de HA, NA en M eiwitten zullen vervangen worden door segmenten van influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) en één gensegment (PB1) door dat van influenza A/Texas/1/77 (H3N2). Verder bevat dit gg-virus een deletie in het gen dat codeert voor het niet-structurele eiwit NS1. De aanvrager verzoekt om de voorgenomen werkzaamheden met deze zogenaamde H5N1 delNS1 gg-stam uit te mogen voeren op inperkingsniveau II.

Eerder heeft de COGEM geadviseerd dat werkzaamheden met bepaalde influenzavirusstammen op inperkingsniveau II ingeschaald kunnen worden, mits de uitgangsstam sterk verzwakt is.

H5N1 delNS1 is gedeeltelijk gebaseerd op de avirulente en sterk verzwakte influenzavirusstam A/Puerto Rico/8/34. De COGEM is van oordeel dat uitwisseling van de HA, NA, M en PB1 segmenten (waarbij géén polybasische klievingsplaats in HA aanwezig is), geen invloed heeft op het geattenuerde fenotype van A/Puerto Rico/8/34. Bovendien is het NS1 gen van het gg-virus verwijderd. Hierdoor is H5N1 delNS1 minder goed in staat de antivirale respons van de gastheer te onderdrukken dan A/Puerto Rico/8/34. De COGEM is van oordeel dat H5N1 delNS1, verzwakt is ten opzichte van de - in pathogeniteitsklasse 2 ingedeelde - stam A/Puerto Rico/8/34.

Op grond hiervan is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau II, onder navolging van de gestelde 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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Advies inschaling werkzaamheden met gg-FLUAV H5N1 delNS1 (4:3:1 reassortant)

COGEM advies CGM/200415-02

1. Inleiding

Naar aanleiding van een aanvraag tot wijziging van vergunningaanvraag (IG 17-094), ingediend door het HALIX B.V., is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) genaamd H5N1 delNS1 (4:3:1 reassortant). Dit betreft een uitbreiding van een reeds afgegeven vergunning, waarover de COGEM in het verleden tweemaal positief heeft geadviseerd.^{1,2} De aanvrager wil nu dezelfde werkzaamheden uitvoeren met gg-FLUAV H5N1 delNS1 en verzoekt om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden met dit gg-virus naar inperkingsniveau II. De aanvrager wil vaccinmateriaal gaan produceren ten behoeve van een klinische studie.

2. *Influenza A virus* (FLUAV)

2.1 Genomische organisatie *Influenza A virus*

Influenza A virus (FLUAV) behoort binnen de familie *Orthomyxoviridae* tot het genus *Alphainfluenzavirus*.³ Het RNA genoom van FLUAV bestaat uit acht unieke genoomsegmenten. Deze coderen voor de virale eiwitten, PB1, PB2 en PA (deze drie eiwitten vormen het RNA-polymerase complex), het nucleoproteïne (NP), de matrixeiwitten M1 en M2, het haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). En voor de niet-structurele eiwitten NS1 en NEP ('nuclear export protein', voorheen bekend als NS2).^{4,5}

Het niet-structurele NS1 eiwit heeft vele functies en is onder meer een belangrijke antagonist van de cellulaire interferon (IFN)-gemedieerde antivirale respons van de gastheer die optreedt na infectie.^{6,7} De HA en NA oppervlakte-eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.^{8,9} Het HA eiwit is verantwoordelijk voor de aanhechting van het virus aan de gastheer cel. Het NA eiwit speelt een rol bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Het HA eiwit wordt gesynthetiseerd als één enkele polypeptideketen (HA0). Alvorens een gastheer cel geïnfecteerd kan worden door het virus moet HA0 gekleefd worden door cellulaire proteases in HA1 en HA2 subunits.⁵

Het HA eiwit bindt aan sialzuur (SA) groepen (neuraminezuren). Deze SA groepen zijn componenten van glycoproteïnen en glycolipiden (glycoconjugaten) die zich op het oppervlak van zoogdiercellen bevinden. De structuur van deze SA glycoconjugaten verschilt tussen verschillende gastheersoorten, hierdoor is er sprake van soort-specifieke gevoeligheid voor een influenzavirusinfectie.¹⁰

Influenza A virussen worden in verschillende subtypen geclassificeerd op basis van de aanwezige HA en NA oppervlakte-eiwitten (voorbeeld: H3N8 en H5N1). Alle 16 HA en 9 NA subtypen die tot

op heden zijn geïdentificeerd, zijn geïsoleerd uit vogelsoorten.⁵ Daarnaast zijn recent de influenza-achtige virussen HL17NL10 en HL18NL11 geïsoleerd uit vleermuizen. De ‘haemagglutinin-like’ (HL) en ‘neuraminidase-like’ (NL) eiwitten van deze virussen bezitten geen haemagglutinine- en neuraminidase-activiteit.^{11,12,13,14}

2.2 Antigene drift en antigene shift

Influenza A virussen kunnen van genetische samenstelling veranderen als gevolg van ‘antigene drift’ en ‘antigene shift’.

‘Antigene drift’ is een continu proces waarbij puntmutaties optreden tijdens de replicatie van het virale RNA. Dit vindt plaats omdat het RNA-afhankelijke RNA-polymerase van influenza A virussen niet beschikt over ‘proofreading’ activiteit, waardoor replicatiefouten niet gecorrigeerd worden. De accumulatie van puntmutaties kan leiden tot aminozuurveranderingen.^{15,16} Veranderingen in de HA en NA oppervlakte-eiwitten kan er voor zorgen dat het virus niet meer herkend wordt door het immuunsysteem van de gastheer.

Het tweede mechanisme, de zogenaamde ‘antigene shift’, kan plaatsvinden als een cel op hetzelfde moment door twee (of meer) verschillende influenza A virussen geïnfecteerd is (co-infectie). Op dat moment kunnen er genoomsegmenten tussen de virussen uitgewisseld worden en kunnen er influenza A virussen ontstaan met een nieuwe combinatie van de segmenten van beide virussen, zogenaamde ‘reassortanten’. Deze reassortanten kunnen in theorie in zowel vogels, varkens als mensen ontstaan. Door de nieuwe combinatie van segmenten kan het zijn dat er geen of weinig immuniteit bestaat onder een populatie voor dit ‘nieuwe virus’. Wanneer deze virussen makkelijk overgedragen kunnen worden, bestaat de kans dat deze virussen snel verspreiden en veel individuen tegelijkertijd geïnfecteerd raken.^{16,17,18}

2.3 Influenza A virus bij vogels

Wilde watervogels vormen, direct en indirect, een bron voor influenza A virussen die andere soorten kunnen infecteren. Er vindt regelmatig overdracht plaats van aviaire influenza A virussen van wilde (water) vogels naar pluimvee. 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.¹⁹ 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.⁵

Het ziekteverloop veroorzaakt door LPAI virussen is asymptomatisch tot mild, waarbij sprake kan zijn van milde luchtwegaandoeningen, depressie of afname in de eiproductie.⁵ HPAI virussen veroorzaken systemische infecties met ernstige symptomen.⁵ 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).

2.4 Influenza A virus 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. Tevens is het de afgelopen eeuw een aantal keren voorgekomen dat een 'nieuw' reassortant influenzavirus in de humane populatie werd geïntroduceerd en een pandemie veroorzaakte.

Aviaire influenzavirussen die mensen sporadisch infecteren, verspreiden zich in zijn algemeenheid niet efficiënt binnen de humane populatie en overdracht van mens-op-mens is zeldzaam.²⁰ De primaire route waarop mensen geïnfected kunnen raken is waarschijnlijk door direct of nauw contact met geïnfected (dood of levend) pluimvee, of door besmetting in een gecontamineerde omgeving (bijv. op een pluimveemarkt).^{21,22} Het ziektebeeld varieert per subtype, van milde luchtweginfectie (hoesten en koorts) tot ernstige longontsteking, gevolgd door de dood.²²

Aan de mens aangepaste humane influenzavirussen circuleren wereldwijd onder de bevolking en veroorzaken seizoensgebonden uitbraken. Omdat humane seizoensgebonden influenzavirussen affiniteit hebben voor α 2,6-gelinkte SA receptoren die zich bevinden op epitheelcellen in de bovenste luchtwegen van de mens, kunnen deze virussen efficiënt door de lucht via aerosolen worden overgedragen van mens-op-mens.²³ Overdracht kan ook plaatsvinden via direct contact met een besmet individu of via indirect contact via besmette oppervlakten.²⁴

De aan de mens aangepaste influenzavirussen tasten luchtwegen aan. Dit gaat gepaard met symptomen zoals koorts, hoofdpijn, hoesten, keelpijn, niezen en spierpijn (deze ziekte heet in de volksmond griep). Over het algemeen is er sprake van milde tot matige zelflimiterende ziekte en herstelt de patiënt zonder behandeling. Ernstige ziekte en overlijden komen vooral voor bij ouderen en mensen met een onderliggende ziekte; wereldwijd zijn er 290.000 - 650.000 sterftegevallen per jaar.²⁵

3. Beschrijving van gg-FLUAV H5N1 delNS1 (4:3:1 reassortant)

De aanvrager is voornemens werkzaamheden uit te voeren met gg-FLUAV stam H5N1 delNS1 (4:3:1 reassortant), die gedeeltelijk gebaseerd is op de avirulente en sterkt verzwakte laboratoriumstam influenza A/Puerto Rico/8/34. In de reassortant zijn drie gensegmenten (HA, NA en M) vervangen door segmenten van influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), en één gensegment (PB1) door een segment van influenza A/Texas/1/77 (H3N2). Verder bevat dit gg-virus een deletie in het NS1 gen. De aanvrager is van plan een H5N1 delNS1 'master virus seed' stocks te produceren in Vero-cellen om vervolgens het vaccinmateriaal uit te vullen in ampullen. Hij geeft aan dat de werkzaamheden onder 'good manufacturing practice' (GMP) condities zullen plaatsvinden.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft FLUAV sinds 2004 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.^{26,27} De geattenueerde FLUAV stammen A/Puerto Rico/8/34, WSN/33 en A/Port Chalmers/1/73 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{28,29,30}

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-FLUAV.³¹ Zij adviseerde dat de laboratoriumwerkzaamheden met deze gg-virussen minimaal op inperkingsniveau III plaats moeten vinden, maar voegde hier aan toe dat specifieke activiteiten, zoals werkzaamheden met sterk verzwakte virusstammen, mogelijk op een lager niveau (niveau II) uitgevoerd kunnen worden. Ook stelde de COGEM dat verspreiding dient te worden tegen gegaan en contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden. Om voor omlaagschaling van inperkingsniveau III naar niveau II in aanmerking te kunnen komen, heeft de COGEM voor werkzaamheden met gg-FLUAV 6:2 reassortanten de volgende voorwaarden en aanvullende voorschriften geadviseerd:

Voorwaarden

1. De recombinante virussen bestaan uit minimaal zes genoomsegmenten van een niet-virulente, verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen;
2. Voor heterologe HA-coderende genoomsegmenten moet een polybasische klievingsplaats uitgesloten zijn;
3. De heterologe genoomsegmenten zijn volledig gekarakteriseerd en er mogen geen ongedefinieerde mutaties aangebracht zijn.

Voorschriften

- a. Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- b. Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- c. Het dragen van handschoenen is verplicht;
- d. Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen de actueel circulerende humane FLUAV stammen óf een mond- en neuskapje te dragen (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2).

Verder heeft de COGEM nog diverse keren geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV 6:2 reassortanten.^{28,32,33,34,35} In een advies uit 2005 heeft de COGEM influenza A/Puerto Rico/8/34 als avirulent en sterk geattenueerd voor mensen aangemerkt, en geoordeeld dat reassortanten bestaande uit 6 genoomsegmenten van A/Puerto Rico/8/34 en 2 genoomsegmenten (HA en NA) van een wildtype humaan influenza virus (waarbij géén polybasische klievingsplaats in HA aanwezig is), niet virulent zijn voor mensen.²⁸ In dit advies adviseerde de COGEM dat werkzaamheden met gg-virussen bestaande uit 6 of 7 gensegmenten afkomstig van FLUAV A/Puerto Rico/8/34 en 2 of 1 gensegmenten van een ander influenzavirus op inperkingsniveau II uitgevoerd kunnen worden.²⁸

Met betrekking tot de onderhavige vergunning heeft de COGEM in 2017 twee adviezen uitgebracht over werkzaamheden met twee FLUAV 5:2:1 reassortanten.^{1,2} De gg-virussen waren grotendeels gebaseerd op oudervirus FLUAV A/Puerto Rico/8/34 (5 gensegmenten), en bevatten daarnaast het PB1 coderende gensegment van FLUAV A/Texas/77 (H3N2), en de HA en NA coderende gensegmenten van óf FLUAV A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)¹ óf FLUAV A/New Caledonia/20/99 (H1N1)². In het NS1 coderende gensegment van oudervirus A/Puerto Rico/8/34 was een deletie aangebracht. Omdat de 5:2:1 reassortanten een partieel coderend NS1 segment bevatten, en de vijf genoomsegmenten van het uitgangsvirus afkomstig waren van een verzwakte laboratoriumstam (A/Puerto Rico/8/34), achtte de COGEM de risico's bij inschaling van de werkzaamheden op inperkingsniveau II verwaarloosbaar klein. Wel was zij van oordeel dat aan de andere twee hierboven genoemde voorwaarden (2 en 3) voldaan moest worden, en dat dezelfde genoemde vier aanvullende voorschriften (a t/m d) in acht genomen moesten worden.^{1,2}

In 2019 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met 5:3 reassortanten die grotendeels gebaseerd zijn op het sterk verzwakte oudervirus FLUAV A/Leningrad/134/17/57. De COGEM was hierbij van oordeel dat uitwisseling van de HA, NA en NP gensegmenten geen invloed heeft op het geattenueerde fenotype van FLUAV A/Leningrad/134/17/57, indien voldaan aan de hierboven genoemde voorwaarden (2 en 3). Zij oordeelde dat de gg-FLUAV virussen niet pathogener zijn dan de sterk verzwakte stam FLUAV A/Leningrad/134/17/57 en achtte de risico's bij inschaling van de werkzaamheden op inperkingsniveau II verwaarloosbaar klein, onder navolging van de hierboven vier aanvullende voorschriften (a t/m d).³⁶

5. Overwegingen en advies

Conform de indeling van FLUAV in pathogeniteitsklasse 3 worden laboratoriumhandelingen met gg-influenza A virussen over het algemeen op inperkingsniveau III ingeschaald. Echter, voor laagpathogene influenza A virussen, of voor geattenueerde virussen, kan een lagere inperking worden gehanteerd.

De COGEM is gevraagd te adviseren over een uitbreiding van een reeds afgegeven vergunning, aangaande de inschaling van werkzaamheden met gg-virus genaamd H5N1 delNS1. Deze 4:3:1 reassortant is gedeeltelijk gebaseerd op FLUAV A/Puerto Rico/8/34. De aanvrager verzoekt om de voorgenomen werkzaamheden met H5N1 delNS1 uit te mogen voeren op inperkingsniveau II.

Eerder heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met twee 5:2:1 reassortanten bestaande uit 5 gensegmenten van FLUAV A/Puerto Rico/8/34 en drie heterologe gensegmenten (PB1, HA en NA).^{1,2} Verder bevatte deze gg-virussen een (gedeeltelijke) deletie in het NS1 coderende gen. De COGEM was van oordeel dat deze 5:2:1 reassortanten geattenuerd waren ten opzichte van het - in pathogeniteitsklasse 2 ingedeelde - avirulente en geattenueerde oudervirus FLUAV A/Puerto Rico/8/34, vanwege de deletie in het NS1 gen.^{1,2} Door de NS1 deletie zijn de gg-virussen minder goed in staat om de IFN-gemedieerde antivirale respons van de gastheer te onderdrukken.^{1,2,6,7,37} Op grond

hiervan heeft de COGEM geadviseerd de werkzaamheden met deze 5:2:1 reassortanten, onder inachtneming van enkele aanvullende voorschriften, in te schalen op inperkingsniveau II.^{1,2}

Het verschil tussen de bovengenoemde 5:2:1 reassortanten en het onderhavige gg-virus H5N1 delNS1 is dat, wat betreft laatstgenoemde, naast de HA, NA en PB1 gensegmenten óók het M gensegment is uitgewisseld voor een heteroloog segment. H5N1 delNS1 is een 4:3:1 reassortant en bestaat uit vier gensegmenten van influenza A/Puerto Rico/8/34, één gensegment (PB1) van influenza A/Texas/1/77 (H3N2) en drie gensegmenten (HA, NA en M) van influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Verder is op het NS gensegment het ORF van NS1 gedeleteerd en geldt voor het heterologe HA-coderende gensegment dat de aanwezigheid van een polybasische klievingsplaats is uitgesloten.

De aanvrager geeft aan dat uitwisseling van het M gensegment geen invloed heeft op de attenuatie van de A/Puerto Rico/8/34 ‘backbone’ en verwijst ter onderbouwing naar een klinische fase 1 studie van Nicolodi *et al.* (2019) met H5N1 delNS1.³⁸ In deze studie werd de veiligheid en immunogeniciteit van H5N1 delNS1 gedemonstreerd door proefpersonen tweemaal intranasaal te vaccineren met het gg-virus. Op dag 1 ontvingen deze personen een dosis van $6,8 \log_{10}$ of $7,5 \log_{10}$ TCID₅₀ H5N1 delNS1. Indien dit goed werd getolereerd ontvingen zij op dag 29 een tweede dosis van $7,5 \log_{10}$ TCID₅₀. In deze studie toonden de auteurs aan dat H5N1 delNS1 niet werd uitgescheiden: het kon niet worden aangetoond in neusuitstrijkjes 24, 48 en 72 uur na de eerste intranasale toediening.³⁸ Ook verwijzen de auteurs naar andere fase 1 en 1/2 studies met delNS1 (kandidaat)vaccins die deze deficiëntie in shedding hebben bevestigd.^{38,39,40} De COGEM is van oordeel dat deze studie aantoont dat het M gensegment geen rol speelt in het geattenuerde fenotype van het ‘backbone’ virus.³⁸

Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat uitwisseling van HA, NA, PB1 en M gensegmenten voor heterologe segmenten van een ander influenzavirus (waarbij géén polybasische klievingsplaats in HA aanwezig is), geen invloed heeft op het geattenuerde fenotype van influenza A/Puerto Rico/8/34.

De COGEM is van oordeel dat H5N1 delNS1 geattenuerd is ten opzichte van het avirulente en geattenuerde oudervirus A/Puerto Rico/8/34, omdat H5N1 delNS1, door de deletie in het NS1 gen, minder goed in staat is de antivirale respons te onderdrukken dan FLUAV A/Puerto Rico/8/34.

Het bovenstaande en de aard van de voorgenomen werkzaamheden in overweging nemende, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau II. De aanvrager stelt dat H5N1 delNS1 niet beschikt over een polybasische klievingsplaats in het HA eiwit. Aanvullend is de COGEM is van oordeel dat de heterologe gensegmenten volledig gekarakteriseerd moeten zijn.

De COGEM adviseert bij de laboratoriumwerkzaamheden met gg-FLUAV H5N1 delNS1 de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- a. Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- b. Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;

- c. Het dragen van handschoenen is verplicht;
- d. Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen de actueel circulerende humane FLUAV stammen óf een mond- en neuskapje te dragen (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2).

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

Referenties

1. COGEM (2017). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus*. CGM/170712-01
2. COGEM (2017). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Influenza A virus* met eiwitten van het humaan papillomavirus type 16. COGEM advies CGM/171127-01
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 6 april 2020)
4. 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
5. 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
6. Wacheck V *et al.* (2010). A novel type of influenza vaccine: Safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J. Infect. Dis.* 201:354-362
7. García-Sastre A *et al.* (1998). *Influenza A virus* lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330
8. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. *Biomed. Pharmacother.* 54: 196-209
9. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* 11: 227-241
10. 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
11. Ma W *et al.* (2015). Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. *PLoS Pathog.* 11: e1004819
12. Lloren KKS *et al.* (2017). Molecular Markers for Interspecies Transmission of Avian Influenza Viruses in Mammalian Hosts. *Int. J. Mol. Sci.* 18
13. Tong S *et al.* (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 4269-4274
14. Tong S *et al.* (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657
15. Boivin S *et al.* (2010). Influenza A Virus Polymerase: Structural Insights into Replication and Host Adaptation Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 285: 28411-28417

16. Mostafa A *et al.* (2018). Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses* 10
17. Short KR *et al.* (2015). One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus.
18. World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019 <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (bezoekt: 9 april 2020)
19. Avian Influenza. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HPAI.pdf (bezoekt: 6 april 2020)
20. COGEM (2015). Definities van verschillende varianten van Influenza A virus. COGEM advies CGM/151102-02
21. <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/monitoring/viruses-concern.html> (bezoekt: 9 april 2020)
22. World Health Organization (WHO). Influenza (avian and other zoonotic). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic)) (bezoekt: 6 april 2020)
23. Long JS *et al.* (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat. Rev. Microbiol.* 17: 67-81
24. World Health Organization (2017). https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/bod/WHO-INFLUENZA-MortalityEstimate.pdf (bezoekt: 9 april 2020)
25. World Health Organization (2017). https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/bod/WHO-INFLUENZA-MortalityEstimate.pdf (bezoekt: 6 april 2020)
26. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advies CGM/040326-03
27. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
28. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
29. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem. COGEM advies CGM/060724-03
30. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
31. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. COGEM advies CGM/061214-01
32. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advies CGM/100830-02
33. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01.
34. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04.
35. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02

36. COGEM (2019). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Influenza A virus* (FLUAV) 5:3 reassortanten. COGEM advies CGM/191107-01
37. Egorov A (1998). Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 72: 6437-6441
38. Nicolodi C *et al.* (2019). Safety and immunogenicity of a replication-deficient H5N1 influenza virus vaccine lacking NS1. *Vaccine* 37: 3722-3729
39. Mössler C *et al.* (2013). Phase I/II trial of a replication-deficient trivalent influenza virus vaccine lacking NS1. *Vaccine* 31: 6194-6200
40. Wacheck V *et al.* (2010). A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J. Infect. Dis.* 201: 354-362