

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

**DATUM** 16 december 2020  
**KENMERK** CGM/201216-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2  
coronavirussen

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-238\_III-000 getiteld 'Productie van NL63-SARS-CoV-2 hybride coronavirussen als mogelijk vaccin tegen COVID 19', ingediend door de Stichting Biomedical Primate Research Centre, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een chimeer coronavirus afgeleid van *Human coronavirus NL63* (HCoV-NL63) waarin minimaal één en maximaal vier structurele genen uitgewisseld zijn met die van SARS-CoV-2. De aanvrager is voornemens deze NL63-SARS-CoV-2 chimere te produceren en te karakteriseren met behulp van flowcytometrie en door kruisinfecties van de chimere virussen in verschillende cellijnen.

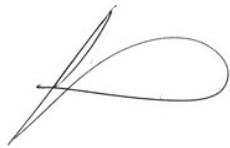
Zowel HCoV-NL63 als SARS-CoV-2 hebben de mens als gastheer. Waar HCoV-NL63 een voornamelijk zelflimiterend ziektebeeld geeft, kan infectie met SARS-CoV-2 een ernstiger ziekteverloop geven (COVID-19). De structurele genen van deze coronavirussen zijn mogelijk betrokken bij pathogeniteit, virulentie en transmissie van de virussen. De COGEM is van oordeel dat de uitwisseling van de structurele genen van HCoV-NL63 met die van SARS-CoV-2 gepaard kan gaan met een verandering van de pathogeniteitskenmerken. Zij acht het onwaarschijnlijk dat de chimere virussen pathogener of virulenter zijn dan SARS-CoV-2, maar zij kan niet uitsluiten dat de pathogeniteit, virulentie of verspreidingskarakteristieken van de chimere virussen vergelijkbaar kunnen zijn met die van SARS-CoV-2.

Alles in overweging nemende kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde 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

# Inschaling van werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2 coronavirussen

## COGEM advies CGM/201216-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2 virussen (IG 20-238), ingediend door het Biomedical Primate Research Centre. De aanvrager is voornemens chimere coronavirussen te vervaardigen door één of meerdere structurele genen uit *Human coronavirus NL63* (HCoV-NL63) uit te wisselen met die van Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Hiervoor wordt *in vitro* RNA geproduceerd van chimere DNA constructen, dat getransfecteerd wordt in verschillende cellijnen om infectieuze chimere virusdeeltjes te produceren. Vervolgens worden de chimere gg-NL63-SARS-CoV-2 virusdeeltjes verder moleculair en biochemisch gekarakteriseerd. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden op ML-III (met enkele aanvullende voorschriften) uit te mogen voeren.

### 2. Coronavirussen

Coronavirussen (familie *Coronaviridae*) worden onderverdeeld in vier genera, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* en *Deltacoronavirus*.<sup>1</sup> Gamma- en deltacoronavirussen infecteren voornamelijk vogels, en alpha- en betacoronavirussen kunnen verschillende zoogdiersoorten infecteren, waaronder de mens. Coronavirussen zijn normaal gesproken zeer soort-specifiek, maar hebben de potentie om zich aan te passen aan een nieuwe gastheer en hierbij van dier op mens (zoönose) of van mens op dier (omgekeerde zoönose) over te springen ('host-shifting'). Er zijn oorspronkelijk vier verschillende coronavirussen geïdentificeerd die mensen kunnen infecteren; HCoV-229E, -NL63, -OC43, en -HKU1. In de laatste decennia zijn daar de drie (zoönotische) virussen, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) en Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), en het huidige circulerende SARS-CoV-2 aan toegevoegd.<sup>2</sup>

#### 2.1 *Human coronavirus NL63*

De virussoort *Human coronavirus NL63* (HCoV-NL63) behoort tot het genus *Alphacoronavirus*. HCoV-NL63 is in 2004 geïsoleerd uit een kind van 7 maanden oud met bronchiolitis en conjunctivitis.<sup>3</sup> Ook is het virus vrijwel gelijktijdig geïsoleerd uit een kind van 8 maanden oud met pneumonie.<sup>4</sup> Dit coronavirus circuleert wereldwijd continu door de humane populatie. Analyse van humaan serum op neutraliserende antilichamen tegen HCoV-NL63 wijst uit dat vrijwel alle volwassenen gedurende hun leven geïnfecteerd zijn geweest met dit virus.<sup>5</sup> HCoV-NL63 kan bij mensen zowel de bovenste als lagere luchtwegen infecteren. Infectie is in het algemeen zelflimiterend, maar kan gepaard gaan met milde symptomen, zoals koorts, hoesten, keelpijn en rhinitis. In kinderen, ouderen en immunogecompromitteerden kan het virus een ernstiger ziektebeeld (infectie van de lagere luchtwegen, bronchiolitis of kroep) geven.<sup>6</sup> Hoewel genetisch verwante virussen uit vleermuizen zijn geïsoleerd, is er nog onduidelijkheid over de oorspronkelijke gastheer van HCoV-NL63.<sup>2</sup>

## **2.2 SARS-CoV-2**

Sinds december 2019 is er een wereldwijde pandemie gaande met een nieuw coronavirus uit de soort *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (genus *Betacoronavirus*), genaamd SARS-CoV-2.<sup>7</sup> SARS-CoV-2 infecties zijn ook onder meer bij honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen vastgesteld.<sup>8</sup>

De SARS-CoV-2 pandemie is in China begonnen, maar heeft zich snel op wereldwijde schaal verspreid, waarbij Europa ook zwaar getroffen is.<sup>9</sup> Besmetting met SARS-CoV-2 kan bij de mens onder andere leiden tot koorts, respiratoire symptomen, longontsteking en neurologische symptomen, met in het ergste geval de dood tot gevolg. Het ziektebeeld dat dit virus veroorzaakt wordt COVID-19 genoemd. Op basis van de huidige gegevens wordt ongeveer 15-30% van de gediagnostiseerde COVID-19 gevallen opgenomen in het ziekenhuis en heeft 2-5% daarvan een ernstig verloop van de ziekte en is opname op de intensive care nodig.<sup>10,11</sup> Echter, vanwege onderrapportage van het totale aantal geïnfecteerde personen, moeten deze getallen met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Er is sprake van overdracht van SARS-CoV-2 van mens-op-mens. Het virus wordt voornamelijk overgedragen via respiratoire druppeltjes ('respiratory droplets') die ontstaan als een geïnfecteerd persoon hoest, niest of praat.<sup>10,11</sup> Onder bepaalde condities is verspreiding via aerosolen mogelijk, voornamelijk in ruimtes waar veel mensen aanwezig zijn en slechte ventilatie is.<sup>12</sup>

## **2.3 Genoomorganisatie coronavirussen**

Coronavirussen bezitten een enkelstrengs positief RNA genoom dat omgeven is door een eiwitmantel (nucleocapside) en een membraan (envelop). Het genoom van alle coronavirussen is op een vergelijkbare wijze georganiseerd; twee grote, deels overlappende 'open reading frames' (ORFs, *Ia* en *Ib*) bevinden zich aan het 5' uiteinde van het genoom, beslaan ongeveer twee derde van het genoom en coderen voor de replicase-polyproteïnen die een rol spelen bij RNA-replicatie. De andere ORFs aan het 3' uiteinde coderen voor de structurele eiwitten S ('spike'), E ('envelope') en M ('membrane') en het N eiwit ('nucleocapsid') en de zogenoemde 'accessory' eiwitten (waaronder ORF3 voor alphacoronavirussen).<sup>13,14</sup> Het S-eiwit is belangrijk voor het gastheerbereik ofwel tropisme van het virus. Het S-eiwit is een glycoproteïne wat als homotrimeer geïntegreerd is in de virale envelop, waarbij onder meer het 'receptor-binding domain' (RBD), dat verantwoordelijk is voor de aanhechting van het virus aan de receptor van de gastheercel, uit het virusdeeltje steekt. Na binding aan de receptor vinden structurele veranderingen plaats in het S-eiwit, die leiden tot de fusie van de virale envelop met het plasmamembraan van de gastheer, waarna het virale RNA de gastheercel kan binnendringen. Zowel HCoV-NL63 als SARS-CoV-2 gebruiken het 'angiotensin convertend enzyme' (ACE)-2 als receptor.<sup>14,15,16,17</sup> Voor SARS-CoV-2 is daarnaast recent een co-receptor geïdentificeerd; neuropilin-1 (NRP1).<sup>18,19</sup>

## **3. Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens chimere NL63-SARS-CoV-2 coronavirussen te produceren en karakteriseren, die in een vervolgstudie getest zullen worden als vaccin tegen COVID-19. De NL63-SARS-CoV-2 chimeren zijn afgeleid van HCoV-NL63, maar hierin zullen één of meerdere structurele genen (S-, E-, M-, en N-genen) van HCoV-NL63 uitgewisseld worden met die van SARS-CoV-2. De

niet-structurele genen *1a*, *1b* (die coderen voor de replicase eiwitten) en *3a* en *3b* (die coderen voor de accessoire eiwitten) van HCoV-NL63 zullen ongewijzigd blijven in de chimere virussen. Hiervoor wordt *in vitro* RNA geproduceerd van chimere DNA constructen, dat getransfecteerd wordt in verschillende cellijnen om infectieuze chimere virusdeeltjes te produceren. Aan het 5' uiteinde van het chimere DNA construct bevindt zich de T7 polymerase promotorsequentie, om RNA productie mogelijk te maken, en aan het 3' uiteinde wordt een polyA-staart geconstrueerd, gevolgd door de sequentie van het hepatitis delta virus ribozym. Dit ribozym zorgt volgens de aanvrager ervoor dat het afgeschreven RNA gelijk van lengte is waardoor de translatie effectiever verloopt, en daardoor de vorming van virusdeeltjes bevordert. Alle mogelijke combinaties van de uitwisseling (minimaal één en maximaal alle vier de genen) kunnen in onderhavige aanvraag gecreëerd worden. Op verschillende locaties, namelijk tussen de ORF van het S-gen en ORF3, tussen ORF3 en het E-gen, tussen het E- en M-gen of tussen het M- en N-gen wordt per construct één marker gen (GFP, mCherry of nano luciferase) geïnsereerd.

De productie van de gg-virussen zal gevolgd worden met behulp van microscopie en de virusdeeltjes worden verder moleculair en biochemisch gekarakteriseerd. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van 'fluorescence-activated cell sorting' (FACS Aria) dat is opgesteld in een VK-II op het ML-III laboratorium met een aerosol-managementsysteem. Ook worden kruisinfecties met andere cellijnen uitgevoerd om te onderzoeken of de geproduceerde chimere virussen andere cellijnen kunnen infecteren.

Omdat bij het uitwisselen van de structurele eiwitten een mogelijk effect op tropisme, transmissiekarakteristiek, gastheerbereik, de pathogeniteit en virulentie niet uit te sluiten is en mogelijk vergelijkbaar zou kunnen worden met de karakteristieken van SARS-CoV-2, verzoekt de aanvrager de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III uit te voeren, waarbij de volgende aanvullende voorschriften gehanteerd zullen worden:

- a. Tijdens de werkzaamheden voor de productie van, en infectie met chimere coronavirussen zal beschermende kleding (Tyvec), dubbele handschoenen, laarzen en adembescherming (Proflow) gedragen worden in het ML-III lab, om accidentele infectie van personen met SARS-CoV-2-achtige virussen te voorkomen;
- b. Na de werkzaamheden wordt de adembescherming gedesinfecteerd met ethanol en deze blijft achter in de sluis, samen met de laarzen. Tyvecs en handschoenen worden als afval via de en suite doorgeefautoclaaf ontsmet en daarna als specifiek ziekenhuisafval afgevoerd (conform bijlage 9, artikel 9.1.1.4.2. r en s van de regeling ggo).

De aanvrager stelt tevens dat alle voorgenomen activiteiten uitgevoerd zullen worden in een VK-II in de ML-III werkruimte.

#### **4. Eerdere COGEM adviezen**

*Human Coronavirus NL63* is door de COGEM in 2009 geclassificeerd in pathogeniteitsklasse 2.<sup>20</sup> In dit advies zijn werkzaamheden met chimere coronavirussen (uitwisseling van het ORF3/4 domein tussen HCoV-229E (ook pathogeniteitsklasse 2) en HCoV-NL63) ingeschaald op inperkingsniveau ML-III, omdat niet uitgesloten kon worden of het ORF3/4 domein een rol zou spelen in de pathogeniteit of transmissie-efficiëntie van deze virussen in mensen.

Het nieuwe SARS-CoV-2 coronavirus is door de COGEM in februari 2020, gezien de aard van de ziekte die het virus veroorzaakt en de afwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling, in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld.<sup>21</sup> In dit advies heeft de COGEM ook geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met (niet-chimere) gg-SARS-CoV-2 virussen. In deze gg-SARS-CoV-2 virussen werden in de natuur voorkomende puntmutaties, deleties of inserties geïntroduceerd in het genoom, en verder werden ‘tags’ of reporter genen, zoals GFP, geïnsereerd in het virale genoom. De COGEM adviseerde werkzaamheden met deze gg-SARS-CoV-2 virussen op inperkingsniveau III uit te voeren, waarbij zij gezien de transmissieroute van het virus, het dragen van handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding en het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril, als aanvullende maatregelen noodzakelijk achtte.

Verder heeft de COGEM in het verleden nog viermaal geadviseerd over werkzaamheden met chimere coronavirussen. In het eerste advies adviseerde de COGEM werkzaamheden met chimere MHVs en chimere Feline infectious peritonitis virussen (FIPV) in te schalen op ML-II inperkingsniveau.<sup>22</sup> De chimeren werden gevormd door uitwisseling van sequenties van MHV stammen onderling of FIPV stammen onderling. Het tweede advies betrof werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus* (IBV).<sup>23</sup> In deze chimere coronavirussen werden regio's of gedeeltes van genen van verschillende IBV stammen met elkaar gecombineerd. De COGEM adviseerde de werkzaamheden met chimere IBV deeltjes, al dan niet in associatie met proefdieren, met in achtneming van aanvullende voorwaarden op inperkingsniveau II in te schalen. Het derde advies betrof werkzaamheden met chimere murine coronavirussen gebaseerd op MHV (variant A59) en waarin de coderende sequenties voor de S- en HE-eiwitten uitgewisseld waren met die van een humaan coronavirus (HCoV-OC43) of van het Bovine coronavirus (BCoV) of een combinatie van beide.<sup>24</sup> Tevens werden specifieke mutaties aangebracht in de S- en HE-genen. De COGEM adviseerde om de werkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau, met aanvullende voorschriften met het oog op mogelijke aerogene verspreiding: het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden en het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II.<sup>24</sup> Tenslotte heeft de COGEM in 2020 geadviseerd over werkzaamheden met chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus.<sup>25</sup> Dit chimere virus wordt als tussenstap vervaardigd tijdens ‘targeted RNA recombination’ om gg-SARS-CoV-2 reporter virussen te genereren, en hierin is de coderende sequentie van het S-eiwit van SARS-CoV-2 uitgewisseld met de overeenkomende sequentie van MHV; er worden meerdere mutanten gemaakt die verschillende reporter genen (o.a. mCherry, GFP, etc.) tot expressie brengen. De COGEM stemde, mede gezien de mogelijkheid dat naast chimeer gg-SARS-CoV-2-MHV-reporter virus ook wildtype SARS-CoV-2 aanwezig is tijdens de werkzaamheden, in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III en de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften; het dragen van handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding en het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril.

## 5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2 virussen. Deze chimere virussen worden geproduceerd met behulp van *in vitro* transcriptie van

chimere DNA-constructen. Het geproduceerde RNA wordt in verschillende animale cellen getransfecteerd om de chimere virussen te produceren. Onderdeel van de karakterisering zijn infectiewerkzaamheden, waarbij onderzocht wordt of de chimere virussen andere cellijnen kunnen infecteren, en flowcytometrie met een FACS Aria opgesteld in een VK-II en voorzien van een aerosol-managementsysteem, waardoor tijdens de analyses een volledig gesloten systeem is gecreëerd, zodat geen uitwisseling met de externe omgeving plaats kan vinden.

De mogelijke effecten van de uitwisseling van de structurele genen (S, E, M en N) op de pathogeniteit, virulentie en transmissie van de chimere virussen zijn nog onbekend. Deze vier structurele eiwitten spelen een belangrijke rol bij de assemblage en infectiositeit van de virusdeeltjes. Het tropisme en de gastheerspecificiteit van coronavirussen worden in belangrijke mate bepaald door het S-eiwit, dat aan de receptor van de gastheercel bindt. Zowel het uitgangsvirus HCoV-NL63 als het SARS-CoV-2 hebben de mens als gastheer en beide coronavirussen maken gebruik van de ACE-2 receptor voor infectie van gastheercellen. Door de uitwisseling van het S-eiwit van HCoV-NL63 met die van SARS-CoV-2, is een verandering van het tropisme en gastheerbereik niet aannemelijk, maar ook niet geheel uit te sluiten aangezien het tropisme ook door andere factoren beïnvloed kan worden. Voor SARS-CoV-2 is recent een co-receptor geïdentificeerd (NRP1) en zijn daarnaast onder meer infecties bij honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen vastgesteld. Het is (nog) niet bekend of HCoV-NL63 ook in andere soorten dan de mens voorkomt.

Het N-eiwit bevindt zich in het virusdeeltje en vormt een complex met het virale RNA genoom, het nucleocapside. Dit eiwit heeft meerdere functies tijdens de replicatiecyclus van het virus en de cellulaire respons na infectie van de gastheercel. Voor het aan SARS-CoV2 verwante SARS-CoV is beschreven dat het N-eiwit als interferon-antagonist kan fungeren, dat bij kan dragen aan de pathogenese van SARS-CoV.<sup>26</sup> Het E-eiwit wordt in kleine hoeveelheden geïncorporeerd in het membraan en is betrokken bij verschillende aspecten van de virusreplicatiecyclus, zoals de assemblage van het virusdeeltje, ‘budding’, en de vorming van het membraan.<sup>27</sup> Uit onderzoek met SARS-CoV waarin het E-eiwit ontbreekt, blijkt dat het gg-virus geattenuëerd is in verschillende diermodellen en er wordt verondersteld dat het E-eiwit een rol kan spelen bij de virulentie van het virus.<sup>27,28</sup> Het M-eiwit maakt (samen met het E-eiwit) onderdeel uit van het virale membraan. Bij de assemblage van het virusdeeltje in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel gaan de structurele eiwitten onderling interacties aan, waarbij het M-eiwit een grote rol speelt.<sup>29</sup>

Het bovenstaande in overweging nemende, kan de COGEM niet uitsluiten dat de uitwisseling van structurele genen tussen HCoV-NL63 en SARS-CoV-2 gepaard kan gaan met een mogelijke verhoging of verlaging van de pathogeniteit, de virulentie of het verspreidingspotentieel van de chimere virussen ten opzichte van het uitgangsvirus (HCoV-NL63). Zij acht het onwaarschijnlijk dat de geproduceerde chimere virussen pathogener of virulenter zijn dan SARS-CoV-2, maar zij kan niet uitsluiten dat de pathogeniteit, virulentie of verspreidingskarakteristieken van de chimere virussen vergelijkbaar kunnen zijn met die van SARS-CoV-2.

De aanvrager is voornemens alle werkzaamheden in een VK-II uit te voeren in een ML-III laboratorium. Ook handelingen met de FACS Aria met aerosol-managementsysteem worden in een VK-II uitgevoerd, waarbij tijdens de analyses een volledig gesloten systeem is gecreëerd. Tijdens de werkzaamheden worden verschillende persoonsbeschermende maatregelen getroffen, namelijk het dragen van beschermende kleding (Tyvec), dubbele handschoenen, laarzen en Proflow adembescherming (een volgelaatsmasker met HEPA-gefilterde aanblaasunit). De COGEM merkt op dat Proflow adembescherming een nog betere bescherming biedt voor de medewerker dan eerder geadviseerde aanvullende maatregelen bij andere vergunningaanvragen met gg-coronavirussen. De COGM adviseert derhalve de door de aanvrager voorgestelde maatregelen in de vergunning op te nemen.

Alles in overweging nemende stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III, onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 3 december 2020)
2. Corman VM *et al.* (2018). Chapter eight: Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Advances in Virus Research* 100: 163-188
3. Van der Hoek *et al.* (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10: 363-373
4. Fouchier RA *et al.* (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 6212–6216
5. Hofmann H *et al.* (2005) Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7988-7993
6. Fielding BC (2011). Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol.* 6: 153-159
7. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 5: 536-544
8. World Organisation for Animal Health (OIE). Questions and Answers on the COVID-19. <https://www.oie.int/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/> (bezoekt: 9 december 2020)
9. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). COVID-19 situation update worldwide, as of 9 December 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases> (bezoekt: 9 december 2020)
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Q&A on COVID-19: Basic facts <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/facts/questions-answers-basic-facts> (bezoekt: 9 december 2020)



11. World Health Organisation (WHO). Q&A on COVID-19 and related health topics  
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub>  
(bezoekt: 9 december 2020)
12. World Health Organisation (WHO). Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?  
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> (bezoekt: 10 december 2020)
13. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273
14. ICTV 9th Report (2009). Coronaviridae. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae) (bezoekt: 9 december 2020)
15. Letko M *et al.* (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569
16. Wan Y *et al.* (2020). Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J. Virol.* 94: e00127-20
17. Walls AC *et al.* (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181: 281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
18. Cantuti-Castelvetri L *et al.* (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 370: 856-860
19. Daly JL *et al.* (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 370: 861-865
20. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen. COGEM advies CGM/090227-03
21. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
22. COGEM (2001). Genetische modificatie van coronavirussen door middel van gerichte homologe RNA recombinatie. COGEM advies CGM/010724-02
23. COGEM (2012). Werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus*. COGEM advies CGM/120104-01
24. COGEM (2016). Inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimere coronavirussen. COGEM advies CGM/161025-02
25. COGEM (2020). Inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus. COGEM advies CGM/200706-01
26. McBride R *et al.* (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 6: 2991-3018
27. Schoeman D & Fielding BC (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 16: 69
28. Jimenez-Guardeño JM *et al.* (2014). The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10: e1004320
29. Masters PS (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66: 193-292