

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

**DATUM** 3 februari 2023  
**KENMERK** CGM/230203-01  
**ONDERWERP** Advies sequentiële infecties verschillende luchtweg-virussen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 22-168\_2.8-000 getiteld '2.8 combi verzoek bij werkzaamheden met paramyxovirussen' ingediend door Erasmus Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

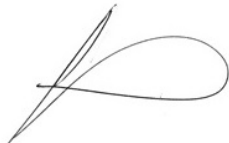
**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met verschillende wildtype of genetisch gemodificeerde (gg-) virussen die de luchtwegen kunnen infecteren (mazelenvirus, parainfluenza virus, respiratoir syncytieel virus (RSV), metapneumovirus en *Influenza A virus* H3N2). Het te gebruiken influenzavirus is niet genetisch gemodificeerd. De aanvrager wenst deze virussen te gebruiken om luchtweg 'organoiden' twee keer achter elkaar (sequentieel) te infecteren. Na de eerste infectieronde wil de aanvrager met een test aantonen dat er geen virus meer in de organoiden aanwezig is, voordat de tweede infectieronde wordt ingezet.

De COGEM is van oordeel dat de kans dat er nieuwe virussen ontstaan door uitwisseling van sequenties die ernstigere ziekte kunnen veroorzaken, verwaarloosbaar klein is. De COGEM is 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.

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 het COGEM lid dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.***

# Sequentiële infecties van luchtweg-organoïden met virussen uit de families *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* en *Orthomyxoviridae*

## COGEM advies CGM/230203-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een adviesvraag van Erasmus Medisch Centrum getiteld '2.8 combi verzoek bij werkzaamheden met paramyxovirussen' (IG 22-168). De aanvrager is voornemens organoïden, bestaande uit gedifferentieerde menselijke respiratoire epitheelcellen en die primair geïnfecteerd zijn met één virus, opnieuw te infecteren met één virus. De te gebruiken virussen betreffen wildtype en genetisch gemodificeerde (gg-) virussen uit de families *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* en *Orthomyxoviridae*. De aanvrager stelt door middel van titraties en een RT-qPCR te willen vaststellen dat de organoïden na de primaire infectie vrij zijn van het oorspronkelijk gebruikte virus, alvorens de sequentiële infectie in te zetten. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden te mogen uitvoeren op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften.

#### 1.1 De te gebruiken virussoorten

De aanvrager wenst de volgende virussoorten uit de families *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* en *Orthomyxoviridae* te gebruiken voor de infectie-experimenten:

- *Paramyxoviridae*:
  - gg-Mazelenvirus (*Measles morbillivirus*) stammen: Edmonston, Edmonston-Zagreb, IC323, en MV-Sudan;
  - gg-Humaan parainfluenza virus 3 (HPIV-3, *Human respirovirus 3*).
- *Pneumoviridae*:
  - gg-Respiratoir syncytieel virus (RSV, *Human orthopneumovirus*) stammen: HRSV-A2, rHRSV-A11, rrRSVBN1, rHRSV-B05, rRSV-D53-BsiWI, rRSV-X- en rRSV-X-ΔG.
  - gg-*Human metapneumovirus* (HMPV).
- *Orthomyxoviridae*:
  - Wildtype *influenza A virus* H3N2.

De gg-virussen bevatten deleties en/of marker- en reporter genen die niet coderen voor een schadelijk genproduct. Het H3N2 influenzavirus betreft een wildtype orthomyxovirus. De initiële infectie en het gebruik van de virussen is ondergebracht in een bestaande kennisgeving. Alleen de tweede (sequentiële) infectie maakt onderdeel uit van onderhavige adviesvraag.

##### 1.1.1 Measles morbillivirus (*MeV*, *mazelenvirus*)

MeV is een zeer besmettelijk virus behorende tot de *Paramyxoviridae* familie dat wordt verspreid via aërosolen. De klinische symptomen ontstaan ongeveer twee weken na infectie en bestaan uit koorts, hoesten, neusverkoudheid en bindvliesontsteking van het oog (conjunctivitis) gevolgd door karakteristieke uitslag.<sup>1</sup> Daarnaast wordt mazelen geassocieerd met immuunsuppressie resulterend in

toegenomen vatbaarheid voor opportunistische infecties.<sup>2</sup> Vaccinatie tegen mazelen is in Nederland opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma.<sup>3</sup>

MeV heeft een niet-gesegmenteerd negatief enkelstrengs RNA-genoom dat omhuld wordt door een membraan.<sup>2,4</sup> Het genoom codeert voor de structurele eiwitten ‘nucleocapside protein’ (N), ‘phosphoprotein’ (P), ‘matrix protein’ (M), ‘fusion protein’ (F), ‘hemagglutinin’ (H) en ‘large protein’ (L), en de niet-structurele eiwitten C en V. Het N- eiwit vormt samen met het RNA-genoom en het RNA-afhankelijke RNA-polymerase, bestaande uit de P- en L- eiwitten, het ribonucleoproteïne complex. Het M-eiwit bekleedt de binnenkant van het membraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. Het F-eiwit wordt als voorlopereiwit gesynthetiseerd (F<sub>0</sub>) en door middel van klieving door cellulaire proteases in de subunits F<sub>1</sub> en F<sub>2</sub> geactiveerd. De glycoproteïnen H en F bevinden zich in het membraan en zijn verantwoordelijk voor de binding aan, en fusie met, de gastheercel.<sup>2,4</sup>

### **1.1.2 Human respirovirus 3 (*Humaan parainfluenza virus 3, HPIV-3*)**

Humaan parainfluenza virus (HPIV) behoort tot de familie *Paramyxoviridae* en is een virus dat de onderste en bovenste luchtwegen infecteert.<sup>5</sup> Transmissie vindt plaats via direct contact met besmette voorwerpen (fomieten) of via het inhaleren van virus bevattende luchtdruppels.<sup>5</sup> Er zijn vier verschillende HPIV serotypen beschreven: 1, 2, 3 en 4 (4a en 4b).<sup>6</sup> De HPIV serotypen 2 en 4 behoren tot het genus *Rubulavirus*, en de HPIV serotypen 1 en 3 behoren tot het genus *Respirovirus*. Van deze serotypen komt serotype 3 het meest voor; op basis van serologie is vast te stellen dat 50-67% van de kinderen tot 1 jaar met HPIV-3 geïnfecteerd zijn (geweest).<sup>7,8</sup> HPIV infecties zijn seizoensgebonden, waarbij HPIV-3 in het voorjaar en de zomer opleeft.<sup>7,8</sup> Een HPIV-infectie in gezonde volwassenen verloopt meestal mild met verkoudheidsklachten, maar kan met name in ouderen, personen met een verzwakt immuunsysteem of longaandoeningen, en (jonge) kinderen leiden tot bronchitis, bronchiolitis, kroep (in kinderen) of longontsteking (pneumonie).<sup>9</sup> Herinfecties met HPIV komen gedurende het hele leven voor.<sup>5</sup>

HPIV heeft een niet-gesegmenteerd, negatief-enkelstrengs RNA-genoom, met een lengte van ca. 15 kb dat codeert voor de 6 structurele eiwitten N, P, M, F, L en het ‘hemagglutinin-neuraminidase’ (HN).<sup>10</sup> Net als voor MeV bindt het N-eiwit aan het virale RNA, waardoor er een template gevormd wordt dat de L- en P-eiwitten (het RNA-afhankelijke RNA-polymerase) tot transcriptie en replicatie in staat stelt.<sup>6</sup> De genoomsequentie van HPIV-1, 2 en 3 bevat tevens de sequentie voor het niet-structurele eiwit C. Het niet-structurele eiwit V is niet in HPIV-1 aanwezig, maar wel in HPIV-2, en wellicht ook in HPIV-3. De virusdeeltjes zijn omgeven door een membraan (envelop) afkomstig van de laatst geïnfecteerde gastheercel.<sup>6</sup>

### **1.1.3 Respiratoir syncytieel virus (RSV, Human orthopneumovirus)**

RSV is een negatief-enkelstrengs RNA-virus in de familie van de *Pneumoviridae*, genus *Orthopneumovirus*, dat alleen pathogeen is voor mensen en één van de meest voorkomende lage luchtweginfecties in zuigelingen en jonge kinderen veroorzaakt. Meestal resulteert infectie met RSV in

milde symptomen in kinderen en volwassenen, maar 2-5% van de jonge kinderen en zuigelingen kan ernstige bronchiolitis ontwikkelen met ziekenhuisopname tot gevolg. Ook kan RSV ernstige infecties in de lage luchtwegen van ouderen veroorzaken, meestal in combinatie met andere ziekten, zoals chronisch obstructieve longziekten of hartfalen.<sup>11</sup> RSV is een zeer infectieus virus, waarbij directe besmetting via contact met besmette oppervlakken een belangrijkere rol speelt dan aëroge verspreiding via niezen of hoesten.<sup>12</sup> Immuniteit tegen RSV is niet volledig beschermend en herinfectie met RSV komt herhaaldelijk voor.<sup>13</sup>

Het genoom van RSV codeert voor 11 virale eiwitten. Het betreft de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2 die alleen na infectie in de gastheercel tot expressie komen, de N, P, M, M2-1, M2-2 en L-eiwitten die betrokken zijn bij transcriptie, replicatie en budding, en de SH, F ('fusion glycoprotein') en G ('attachment glycoprotein') eiwitten betrokken bij binding aan, en infectie van een gastheercel.<sup>14</sup> Het F-eiwit zorgt voor fusie van het virus met het membraan van een gastheercel, waarna het RSV-genoom de cel kan binnendringen. Het G-eiwit zorgt voor binding van RSV aan een gastheercel en is daarnaast van belang voor virale replicatie.<sup>15,16</sup>

#### **1.1.4 Human metapneumovirus (HMPV)**

Het *human metapneumovirus* (HMPV) is een negatief-enkelstrengs RNA-virus behorende tot de familie *Pneumoviridae*, dat in 2001 voor het eerst uit kinderen met luchtweginfecties geïsoleerd en beschreven is.<sup>17,18</sup> Het is een veel voorkomend virus en kinderen tot 5 jaar oud hebben bijna allemaal een keer een HMPV-infectie doorlopen.<sup>19</sup> Het virus infecteert zowel de bovenste als de onderste luchtwegen, en van alle luchtweginfecties waarvoor ziekenhuisopname noodzakelijk is, wordt ongeveer 10% veroorzaakt door een infectie met HMPV.<sup>20</sup> De symptomen van een HMPV-infectie in (jonge) kinderen lijken op die van RSV en kunnen o.a. koorts, hoesten, hypoxie en tachypnoe (snelle ademhaling) omvatten, maar ook (ernstige) bronchiolitis waarvoor ziekenhuisopname noodzakelijk is.<sup>19</sup> In volwassenen veroorzaakt HMPV ongeveer 4 tot 5% van de ernstigere luchtweginfecties, maar meestal leidt infectie tot (milde) griepachtige symptomen. Vooral ouderen en mensen met een verminderde afweer lopen risico tot het ontwikkelen van een ernstigere infectie.<sup>20</sup> HMPV-infecties zijn seizoensgebonden en komen het meest voor in de winter en de lente. Transmissie vindt voornamelijk plaats via fomieten en via secreties en luchtdruppels die vrijkomen bij o.a. hoesten en niezen.<sup>20</sup>

Het HPMV-genoom lijkt op dat van RSV en codeert voor de genen N, P, M, F, M2, SH, G en L. In tegenstelling tot RSV ontbreken in HMPV echter de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2.<sup>19</sup> Het matrix-eiwit 'M', bekleedt de binnenzijde van de lipide-envelop. De glycoproteïnen F, SH en G bevinden zich aan de buitenzijde van de envelop en vormen 'spikes' van 13-17 nm. Het virale RNA is geassocieerd met de eiwitten N, P en L (het RNA-afhankelijke RNA-polymerase) en waarschijnlijk ook aan de factoren M2-1 en M2-2, en vormt samen het nucleocapside.<sup>20</sup>

#### **1.1.5 Influenza A virus H3N2**

*Influenza A virus* (FLUAV) behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en het genus *Alphainfluenzavirus*.<sup>21</sup> 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 ca. 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.

Het negatief-enkelstrengs 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).<sup>22,23</sup>

## 2. Eerder COGEM advies

*Measles morbillivirus* (MeV), *Human respirovirus 3* (HPIV-3), *Human orthopneumovirus* (RSV), *Human metapneumovirus* (HMPV) en *Influenza A virus* H3N2 zijn allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>24</sup>

## 3. Voorgenomen werkzaamheden en voorstel tot inschaling

De aanvrager is voornemens ‘luchtweg-organoïden’ sequentieel (twee keer) te infecteren met de hierboven beschreven virussen. De combinaties van virusfamilies die voor de eerste en tweede infectie zullen worden gebruikt, zijn hieronder beschreven.

Paramyxovirus → Pneumovirus  
Pneumovirus → Pneumovirus  
Pneumovirus → Paramyxovirus  
Paramyxovirus → Paramyxovirus  
Orthomyxovirus → Pneumovirus  
Orthomyxovirus → Paramyxovirus

Tussen twee opvolgende infectie-experimenten zullen enkele dagen na de eerste infectie wasstappen worden uitgevoerd. Deze wasstappen worden weer gebruikt voor RT-qPCR en titratie-experimenten om de hoeveelheid virus (‘viral load’) aan te tonen. De aanvrager geeft aan dat voor deze testen de protocollen van de diagnostiek-afdeling gebruikt zullen worden, die per virus zullen verschillen. Voor de RT-qPCR is de aanvrager voornemens water als negatieve controle te gebruiken. De positieve controle-monsters worden tijdens de RNA extractie ‘gespiked’ met een standaard hoeveelheid Phocine distemper virus. De extractiemethode die de aanvrager voornemens is te gebruiken, is beschreven in de wetenschappelijke literatuur.<sup>25</sup> Voor de titraties stelt de aanvrager dat de protocollen afhankelijk zijn van de gebruikte virussen.

De tweede infectieronde vindt pas plaats wanneer het virus dat in het eerste infectie-experiment werd gebruikt, bij twee opeenvolgende ‘apicale’ wasstappen met intervallen van minimaal 24 uur niet meer

gedetecteerd wordt. Desondanks geeft de aanvrager aan dat er wegens het risico op recombinitie/reassortatie ('antigenic shift') geen sequentiële infecties met de influenzavirussen (Orthomyxovirus) zullen plaatsvinden. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden te mogen uitvoeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij de volgende aanvullende maatregelen in acht worden genomen:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II);
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.

#### **4. Overweging**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij sequentiële infecties worden uitgevoerd met verschillende respiratoire wildtype en gg-virussen. De virussen die de aanvrager voornemens is te gebruiken voor de infectie-experimenten met 'luchtweg-organoiden', betreffen allen respiratoire virussen die in pathogeniteitsklasse 2 zijn ingedeeld. Een risico dat bij herinfectie op kan treden is recombinitie. Om dit risico in te perken is de aanvrager voornemens een test uit te voeren om afwezigheid van het primaire virus aan te tonen. Ook zal de aanvrager geen sequentiële infectie (herinfectie) met *Influenza A* virussen uitvoeren.

##### **4.1 Risico op recombinitie**

Recombinitie tussen virussen is mogelijk wanneer één cel tegelijkertijd door twee of meer virussen geïnfecteerd is. De (gg-)virussen die in onderhavige aanvraag gebruikt zullen worden, zijn allen negatief-enkelstrengs RNA virussen. Met uitzondering van *Influenza A virus* is het RNA genoom van de virussen niet gesegmenteerd. Recombinitie in ongesegmenteerde, negatief-enkelstrengs RNA virussen is mogelijk, maar komt zelden voor.<sup>26,27</sup> De lage mate van recombinitie in deze virussen lijkt een gevolg te zijn van de replicatiestructuren van deze virussen. Zo associëren de genomische en antigenomische RNA moleculen met nucleoproteïnen en vormen zo 'ribonucleoproteïne complexen' (RNPs), wat de kans op hybridisatie met naburige (complementaire) sequenties reduceert.<sup>28</sup> In celculturen is aangetoond dat co-infecties met *Influenza A virus* en RSV leidt tot de vorming van hybride virus partikels (HVP) met een uitgebreider tropisme in de gastheer, maar dat er geen recombinitie tussen de genomen optreedt en er geen nieuwe recombinante virussen worden gevormd.<sup>29</sup> In mensen vinden sequentiële of gelijktijdige infectie met de virussen, die de aanvrager voornemens is te gebruiken, veelvuldig plaats, en recombinitie wordt zelden waargenomen. Uitwisseling van sequenties bij gesegmenteerde negatief-enkelstrengs RNA virussen, zoals *Influenza A virus*, komt daarentegen vaker voor ('reassortment').<sup>28</sup>

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans op recombinitie en vorming van pathogenere of virulentere varianten van de in onderhavige aanvraag te gebruiken ongesegmenteerde, negatief-enkelstrengs RNA virussen verwaarloosbaar klein is. Voor *Influenza A virus* is de kans op recombinitie/reassorteren groter, waardoor sequentiële infecties met orthomyxovirussen voorkomen dienen te worden, zoals ook door de aanvrager is aangegeven.

#### 4.2 Validiteit van de testen om de aanwezigheid van virus aan te tonen

De aanvrager is voornemens tussen twee opvolgende infectie-experimenten enkele dagen na infectie wasstappen uit te voeren ('apical washes') en dat te gebruiken voor de detectie van virus door middel van qPCR en titratie-experimenten. De aanvrager geeft aan dat de experimentele opzet die gebruikt wordt om de 'viral load' vast te stellen overeenkomst met de opzetten die in de diagnostiek worden gebruikt.

De COGEM merkt op dat de aanvrager geen beschrijving van de te gebruiken detectielimiet heeft gegeven. Tevens merkt de COGEM op dat met de door de aanvrager beschreven proefopzet resterend intracellulair aanwezig virus of viraal genetisch materiaal niet zal worden gedetecteerd, waardoor deze test de afwezigheid van primair virus niet kan garanderen.

#### 5. Advies

Al het bovenstaande in overweging nemende, stemt de COGEM in met de voorgenomen werkzaamheden met virussen uit de families *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* en *Orthomyxoviridae* op inperkingsniveau ML-II, waarbij geen sequentiële infecties worden uitgevoerd met virussen uit de familie *Orthomyxoviridae*, en onder toepassing van de volgende aanvullende inperkingsmaatregelen:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II);
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.

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. World Health Organization (WHO) Fact sheets. Measles. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/measles> (bezocht: 24 januari 2023)
2. Griffin DE (2013). Measles virus. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2016). Rijksvaccinatieprogramma. [Vaccinaties tegen infectieziekten | Rijksvaccinatieprogramma.nl](https://www.rivm.nl/vaccinatie) (bezocht: 24 januari 2023)
4. Rima B *et al.* (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Paramyxoviridae*. J. Gen. Virol. 100: 1593-1594
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human Parainfluenza Viruses (HPIVs). [Symptoms of Human Parainfluenza Virus \(HPIV\) Illnesses | CDC](https://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hpi/hpi.htm) (bezocht: 24 januari 2023)
6. Henrickson KJ (2003). Parainfluenza viruses. Clin. Microbiol. Rev. 16: 242-264



7. Knott AM (1994). Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr. Infect. Dis. J.*
8. Han JY *et al.* (2022). Seasonal epidemiological and clinical characteristics of pediatric patients with human parainfluenza virus infection by serotype: a retrospective study. *Viol. J.* 19: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01875-2>
9. Farahmand M *et al.* (2021). The landscape of extrapulmonary manifestations of human parainfluenza viruses: a systematic narrative review. *Microbiol. Immunol.* 65: 1-9
10. Karron, R. A., and Collins, P. L. (2013). "Parainfluenza viruses," in *Fields Virology*, 6th Edn, eds D. M. Knipe and P. M. Howley (Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins), 996–1023
11. Hall CB *et al.* (2013). Clinical and epidemiological features of respiratory syncytial virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 372: 39-57
12. Falsey AR & Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 371-284
13. Openshaw PJM *et al.* (2017). Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu. Rev. Immunol.* 35: 501–532
14. Lee WJ *et al.* (2012). Complete Genome Sequence of Human Respiratory Syncytial Virus Genotype A with a 72-Nucleotide Duplication in the Attachment Protein G Gene. *J. Virol.* 86: 13810-13811
15. Teng MN *et al.* (2001). Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* 289: 283-296
16. Maher CF *et al.* (2004). Recombinant respiratory syncytial virus lacking secreted glycoprotein G is attenuated, non-pathogenic but induces protective immunity. *Microbes Infect.* 6: 1049-1055.
17. van den Hoogen BG *et al.* (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7(6), 719–724.
18. ICTV Taxonomy browser [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202101648](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101648) (bezocht: 25 januari 2023)
19. Kahn JS (2006). Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 546-557
20. Feuillet F *et al.* (2012). Ten years of human metapneumovirus research. *J. Clin. Virol.* 53: 97-105
21. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 8 februari 2022)
22. 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
23. 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
24. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
25. Hoek RAS *et al.* (2013). Incidence of viral respiratory pathogens causing exacerbations in adult cystic fibrosis patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 45: 65-69
26. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3: 1358-1373

27. Patiño-Galindo JA *et al.* (2021). Global patterns of recombination across human viruses. *Mol. Biol. Evol.* 38: 2520-2531
28. Simon-Lorieri E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 617-626
29. Haney J *et al.* (2021). Coinfection by influenza A virus and respiratory syncytial virus produces hybrid virus particles. *Nat. Microbiol.* 7: 1879-1890