

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

**DATUM** 07 november 2019  
**KENMERK** CGM/191107-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden met gg-FLUAV 5:3 reassortanten

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 18-124\_2.8-001 getiteld 'Omlaagschaling van werkzaamheden met geattenueerde Influenza A/Leningrad/134/17/57 virusstam van ML-III naar ML-IIk', ingediend door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) Influenza A virus (FLUAV) stam A/Leningrad/134/17/57. Drie gensegmenten, coderend voor de HA, NA en NP eiwitten van dit virus zullen vervangen worden door segmenten van hoog- en laagpathogene influenza A virussen. Eerder heeft de COGEM geadviseerd dat werkzaamheden met bepaalde influenzavirusstammen op inperkingsniveau II ingeschaald kunnen worden, mits de uitgangsstam sterk verzwakt is.

De gg-virussen zijn grotendeels gebaseerd op de sterk verzwakte influenzavirusstam A/Leningrad/134/17/57. De COGEM is van oordeel dat uitwisseling van de HA, NA en NP segmenten (waarbij géén polybasische klievingsplaats in HA aanwezig is) geen invloed heeft op het geattenueerde fenotype van A/Leningrad/134/17/57. Zij is van oordeel dat de gg-FLUAV virussen niet pathogener zijn dan de sterk verzwakte stam A/Leningrad/134/17/57.

Gezien de attenuatie van de betreffende stammen 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  
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

# **Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Influenza A virus* (FLUAV) 5:3 reassortanten**

## **COGEM advies CGM/191107-01**

### **1. Inleiding**

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 18-124) ingediend door het RIVM, is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) 5:3 reassortanten die grotendeels gebaseerd zijn op stam A/Leningrad/134/17/57. De aanvrager stelt dat het 'backbone' virus geattenuëerd is en verzoekt om omlaagschaling van de werkzaamheden naar inperkingsniveau II.

### **2. *Influenza A virus* (FLUAV)**

Influenzavirussen kunnen onderscheiden worden in 4 soorten: *Influenza A virus* (FLUAV), *Influenza B virus* (FLUBV), *Influenza C virus* (FLUCV) en *Influenza D virus* (FLUDV). FLUAV behoort binnen de familie *Orthomyxoviridae* tot het genus *Alphainfluenzavirus*.<sup>1</sup>

#### **2.1 Genomische organisatie *Influenza A virus***

Het enkelstrengs RNA genoom van *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten. Deze coderen voor minstens 10 eiwitten, waaronder drie eiwitten die het RNA-polymerase vormen (PB1, PB2 en PA), het nucleoproteïne (NP), de matrixeiwitten M1 en M2, de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).<sup>2,3</sup> Het HA eiwit van influenzavirussen is verantwoordelijk voor de aanhechting van het virus aan de gastheercel. Het wordt gesynthetiseerd als een enkele polypeptideketen (HA0). Alvorens een gastheercel geïnfecteerd kan worden door het virus moet HA0 gekleefd worden door cellulaire proteases.<sup>3</sup> Het NA eiwit speelt een rol bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. De HA en NA eiwitten zijn belangrijk voor de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.<sup>4,5</sup> Tot op heden zijn 16 HA subtypen (H1 t/m H16) en 9 NA subtypen (N1 t/m N9) geïdentificeerd in wilde vogels, het reservoir van influenzavirussen. Daarnaast zijn recent de influenza-achtige virussen HL17NL10 en HL18NL11 geïsoleerd uit vleermuizen.<sup>6</sup>

#### **2.2 *Influenza A virus* bij vogels**

Wilde watervogels vormen, direct en indirect, een bron voor influenza A virussen die andere soorten kunnen infecteren. De epitheelcellen in de darmen van de wilde vogels worden geïnfecteerd en het virus wordt in hoge concentraties uitgescheiden in de feces. Via besmet oppervlaktewater vindt efficiënte overdracht van vogel-op-vogel plaats via de fecaal-orale route. Er vindt regelmatig overdracht plaats van aviaire influenza A virussen van wilde (water) vogels naar pluimvee; ook kan er in bepaalde gevallen transmissie naar zoogdieren en mensen optreden.<sup>3,7</sup>

Aviaire influenzavirussen worden op basis van hun pathogeniteit bij kippen geclassificeerd als hoogpathogene aviaire influenza (HPAI) of laagpathogene aviaire influenza (LPAI) virussen.<sup>5</sup> LPAI

virussen komen van nature voor bij watervogels en veroorzaken in het algemeen geen tot milde symptomen bij pluimvee (kippen, eenden, ganzen en kalkoenen) en wilde vogels. HPAI virussen worden minder vaak aangetroffen bij watervogels, maar kunnen bij pluimvee ernstige ziekte met hoge mortaliteit veroorzaken.

Om een gastheer te kunnen infecteren moet het HA0 eiwit van een influenzavirus door cellulaire proteases worden gekleefd. LPAI virussen hebben een arginine residu bij de klievingsplaats van het HA eiwit, dit kan enkel door proteases die geproduceerd worden in de darmen en luchtwegen worden gekleefd. LPAI virussen veroorzaken lokale infecties in de luchtwegen en het darmstelsel. Het ziekteverloop is asymptomatisch tot mild, waarbij sprake kan zijn van milde luchtwegaandoeningen, depressie of afname in de eiproductie.<sup>3</sup>

HPAI virussen hebben meerdere basische aminozuren in de klievingsplaats van het HA eiwit, dit kan gekleefd worden door proteases die in het hele lichaam tot expressie komen.<sup>3,8</sup> Hierdoor kunnen HPAI virussen systemische infecties veroorzaken met ernstige klinische symptomen en hoge mortaliteit onder pluimvee.<sup>3</sup>

Naast de aanwezigheid van een polybasische klievingsplaats zijn er nog andere virulentiemarkers die de pathogeniteit van influenzavirussen kunnen bepalen. Zo bezit bijvoorbeeld de influenzastam uit 1918 (type H1N1), die verantwoordelijk was voor de Spaanse griep, geen polybasische klievingsplaats in het HA eiwit.<sup>9,10,11,12</sup>

### **2.3 Influenza A virus bij de mens**

Influenza A virussen die bij de mens voorkomen kunnen onderscheiden worden in humane seizoensgebonden influenzavirussen die de mens als primaire gastheer hebben, en influenzavirussen die circuleren in dieren en sporadisch mensen infecteren, zoals aviaire influenzavirussen of varkens influenzavirussen.

Dierlijke influenzavirussen die mensen sporadisch infecteren, verspreiden zich niet efficiënt binnen de humane populatie en overdracht van mens-op-mens is zeldzaam.<sup>13</sup> De primaire route waarop mensen geïnfecteerd kunnen raken is waarschijnlijk door directe en indirecte blootstelling aan geïnfecteerd (dood of levend) pluimvee, of door besmetting in een gecontamineerde omgeving (bijv. een vogelmarkt).<sup>14</sup>

De ernst van het ziektebeeld varieert van milde infecties van de bovenste luchtwegen (koorts en hoesten), tot snel optredende ernstige longontsteking, 'acute respiratory distress syndrome' (ARDS) (synoniem shocklong; de verschijnselen zijn kortademigheid, blauwe verkleuring van de huid en slijmvlies, verlaging van de arteriële zuurstofspanning en longoedeem), shock of zelfs de dood.<sup>14</sup>

Humane seizoensgebonden influenzavirussen circuleren wereldwijd onder de bevolking, verspreiden zich efficiënt van mens-op-mens en veroorzaken seizoensgebonden uitbraken. Het virus wordt door de lucht via aerosolen overgedragen, maar overdracht kan ook plaatsvinden via direct contact of via indirect contact via besmette oppervlakten. Het virus infecteert luchtwegepitheelcellen en kan in deze cellen repliceren. Bij het vrijkomen van nieuwe virusdeeltjes sterven de besmette epitheelcellen af.

Door deze beschadigingen aan het epitheel kunnen secundaire bacteriële infecties ontstaan, die een belangrijke oorzaak zijn van overlijden na infectie met het influenza virus.<sup>16</sup>

Bij gezonde mensen kan een infectie zonder ziekteverschijnselen verlopen, maar meestal is infectie geassocieerd met milde tot matige symptomen, zoals koorts en koude rillingen, hoesten, spierpijn, hoofdpijn, en moeheid (griep). Deze klachten duren enkele dagen tot een week. Bij ouderen en mensen met een onderliggend ziektebeeld, kan een infectie met een *Influenza A virus* leiden tot ernstigere ziekteverschijnselen en tot een verhoogde kans op overlijden. Jaarlijkse griep epidemieën zijn verantwoordelijk voor 3 tot 5 miljoen ernstige ziektegevallen en 290.000 tot 650.000 doden wereldwijd.<sup>15,16,17</sup>

#### **2.4 Antigene drift en antigene shift**

Wanneer een cel op hetzelfde moment door verschillende influenza A virussen wordt geïnfecteerd, kunnen genoomsegmenten tussen de virussen uitwisselen. Hierdoor kunnen virussen ontstaan die segmenten van verschillende virussen bevatten, zogenaamde ‘reassortanten’. Dit proces wordt ‘antigene shift’ genoemd en kan ervoor zorgen dat er nieuwe virussen ontstaan die niet eerder bij mensen voorkwamen en waartegen de meeste mensen geen immuniteit hebben. ‘Antigene drift’ is een continu proces waarbij mutaties optreden in het virale RNA tijdens replicatie, waardoor het virus niet meer herkend wordt door de antistoffen van het afweersysteem. Om deze reden is het noodzakelijk dat het griepvaccin ieder jaar aangepast wordt aan de verwachte circulerende griepvirussen.<sup>16</sup>

### **3. Beschrijving van de gg-FLUAV 5:3 reassortanten**

De aanvrager is voornemens werkzaamheden uit te voeren met 5:3 reassortanten gebaseerd op FLUAV A/Leningrad/134/17/57. De gg-FLUAV virussen zijn door derden gegenereerd met behulp van een op plasmiden gebaseerd ‘reverse genetics’ systeem. Vijf genoomsegmenten (PA, PB1, PB2, M en NS) zijn afkomstig van de levend verzwakte vaccinstam A/ Leningrad/134/17/57 (H2N2).<sup>27</sup> In de reassortanten zijn de gensegmenten coderend voor de HA, NA en NP eiwitten uitgewisseld met heterologe gensegmenten van hoog- en laagpathogene influenza A virussen. Deze donorvirussen beschikken niet over een polybasische klievingssite in het HA eiwit en het betreft niet de pandemische stam uit 1918. Alle gensegmenten zijn compleet.

De aanvrager is voornemens werkzaamheden met de gg-virussen in associatie met verschillende soorten animale cellen (waaronder geëmbryoneerde kippeneieren), en in associatie met proefdieren (muizen en fretten) uit te voeren. Na blootstelling aan de gg-virussen zullen organen en weefsels van de proefdieren onderzocht worden (onder meer FACS experimenten).

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

De COGEM heeft FLUAV sinds 2004 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>18,19</sup> De geattenueerde FLUAV stammen A/Puerto Rico/8/34, WSN/33 en A/Port Chalmers/1/73 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>19,20,21</sup>

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-FLUAV.<sup>22</sup> 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).

Voor infectie van geëmbryoneerde kippeneieren met gg-FLUAV dienen naast de hierboven genoemde voorschriften a t/m d voor de volgende aanvullende voorschriften aan toegevoegd te worden:<sup>20</sup>

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

Voor handelingen met proefdieren in associatie met laagpathogene gg-FLUAV stammen dient hieraan naast de hierboven genoemde voorschriften a t/m d het volgende aanvullende voorschrift te worden toegevoegd:<sup>23</sup>

- Dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.

Verder heeft de COGEM nog diverse keren geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV 6:2 reassortanten.<sup>20,24,25,26</sup> In 2007 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de

omlaagschaling van werkzaamheden met een 6:2 reassortant gebaseerd op het oudervirus A/Leningrad/134/17/57 met twee gensegmenten (HA en NA) van stam A/Indonesia/5/05 (H5N1).<sup>27</sup> In dit advies oordeelde de COGEM dat A/Leningrad/134/17/57 sterk geattenuëerd is vanwege haar ‘cold adapted / temperature sensitive / attenuated’ (ca/ts/att) fenotype, en adviseerde zij de werkzaamheden met de 6:2 reassortant op ML-II inperkingsniveau in te schalen.<sup>27</sup>

In 2017 heeft de COGEM twee adviezen uitgebracht over werkzaamheden met FLUAV 5:2:1 reassortanten.<sup>16,28</sup> De gg-virussen waren 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)<sup>16</sup>, óf FLUAV A/New Caledonia/20/99 (H1N1)<sup>28</sup>. 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.

## 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 geattenuëerde virussen, kan een lagere inperking worden gehanteerd.

De aanvrager is voornemens werkzaamheden met gg-FLUAV 5:3 reassortanten te verrichten die bestaan uit vijf gensegmenten van de vaccinstam A/ Leningrad/134/17/57 (H2N2), waarbij de HA, NA en NP gensegmenten afkomstig zijn van hoog- en laagpathogene influenza A virussen. Deze donorvirussen beschikken niet over een polybasische klievingssite in het HA eiwit en het betreft niet de pandemische stam uit 1918.

De COGEM heeft in het verleden diverse keren geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV 6:2 reassortanten, waaronder over werkzaamheden met een 6:2 reassortant gebaseerd op het oudervirus (gg-) A/Leningrad/134/17/57.<sup>20,24,25,26,27</sup>

De COGEM heeft eerder geoordeeld dat het ‘backbone’ virus A/Leningrad/134/17/57 waarop de 5:3 reassortanten grotendeels zijn gebaseerd, sterk geattenuëerd is vanwege haar ca/ts/att fenotype.<sup>27</sup> Door het *ts* fenotype kan het virus enkel repliceren in de bovenste luchtwegen, dit is de hoofdoorzaak waardoor A/Leningrad/134/17/57 geattenuëerd is voor mensen (*att* fenotype) ten opzichte van de wildtype ouderstam A/Leningrad/134/57 waarvan het is afgeleid.<sup>27,29,30</sup> De stabiliteit van het *ts* fenotype van dit vaccivirus is in meerdere studies aangetoond, onder andere met *in vitro* experimenten, in diermodellen en klinische studies.<sup>30</sup>

De aanvrager stelt dat uitwisseling van HA, NA en NP gensegmenten geen invloed heeft op de attenuatie van A/Leningrad/134/17/57. Hij onderbouwt dit met literatuurgegevens.

De aanvrager verwijst naar een studie van Isakova-Sivak *et al.* (2011).<sup>30</sup> Deze studie toont, in lijn met eerdere studies, met *in vitro* experimenten aan dat het *ts* fenotype van A/Leningrad/134/17/57 veroorzaakt wordt door mutaties in de PB1 en PB2 coderende gensegmenten.<sup>30</sup> Ook laten resultaten van deze studie zien dat aanwezigheid van wildtype HA en NA gensegmenten niet interfereert met het *ts* fenotype van A/Leningrad/134/17/57.<sup>30</sup>

Verder verwijst de aanvrager naar een ander studie van Isakova-Sivak *et al.* (2019) waarin met *in vitro* experimenten wordt aangetoond dat 6:2 reassortanten gebaseerd op A/Leningrad/134/17/57 met heterologe NP (afkomstig van pH1N1) en chimeer HA (pH1N1 ‘stalk’ en H5N1/H8N4/H9N2 ‘head’) gensegmenten, het *ts* fenotype behouden.<sup>31</sup> Ook tonen de auteurs in deze studie de immunogeniciteit en veiligheid van intranasale toediening van deze 6:2 reassortanten bij fretten aan. Gevaccineerde dieren waren beschermd tegen infectie met H1N1pdm09.<sup>31</sup>

Als laatste verwijst de aanvrager naar een studie van Korenkov *et al.* (2018).<sup>32</sup> In deze studie zijn 5:3 reassortanten gegenereerd waarbij vijf gensegmenten afkomstig waren van A/Leningrad/134/17/57 en drie heterologe gensegmenten (HA, NA en NP) afkomstig waren van wildtype H3N2 virussen (TX/12, SW/13 en HK/14). Met *in vitro* experimenten laten de auteurs zien dat uitwisseling van HA, NA en NP gensegmenten de *ts* en *ca* fenotypes van A/Leningrad/134/17/57 niet beïnvloedt. Ook is de veiligheid, replicatie en immunogeniciteit van de 5:3 reassortanten vergeleken met 6:2 reassortanten door fretten intrasale te vaccineren. De virussen met zowel een 5:3 als 6:2 genoomsamenstelling waren geattenuerd, replicateerden in dezelfde mate in de bovenste luchtwegen van de fretten, en veroorzaakten een humorale immuunrespons bij de dieren. Alle gevaccineerde dieren waren beschermd tegen infectie met heterologe H3N2 virussen. Deze studie toont aan dat het NP gensegment geen rol speelt in het geattenuerde fenotype van het ‘backbone’ virus.<sup>32</sup>

Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat uitwisseling van HA, NA en NP gensegmenten voor heterologe segmenten van hoog- en laagpathogene influenza A virussen, geen invloed heeft op het geattenuerde fenotype van A/Leningrad/134/17/57. De 5:3 reassortanten beschikken niet over een polybasische klievingsplaats in het HA eiwit en de heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd. De COGEM is van oordeel dat de 5:3 reassortanten uit onderhavige aanvraag niet pathogener zijn dan de sterk geattenuerde stam A/Leningrad/134/17/57.

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 COGEM adviseert bij de laboratoriumwerkzaamheden met de 5:3 reassortanten 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).

De COGEM merkt op dat de vergunningverlenende instantie in haar ontwerpbeschikking als aanvullend voorschrift heeft opgenomen dat medewerkers onder meer een veiligheidsbril moeten dragen als zij niet gevaccineerd zijn tegen humaan FLUAV. De COGEM heeft eerder geoordeeld dat het dragen van een veiligheidsbril alleen noodzakelijk is bij werkzaamheden met hoogpathogene gg-H7 influenzavirussen die ingeschaald zijn op inperkingsniveau III. Het dragen van een veiligheidsbril bij ML-II werkzaamheden met laagpathogene gg-H7 influenzavirussen acht zij niet noodzakelijk.<sup>22,25</sup> Met betrekking tot de werkzaamheden uit de onderhavige aanvraag met de sterk verzwakte 5:3 reassortanten (waaronder gg-H7 influenzavirussen), acht de COGEM het daarom niet noodzakelijk dat medewerkers een beschermende bril dragen.

Voor de werkzaamheden met de 5:3 reassortanten in associatie met geëmbryoneerde kippeneieren dienen in aanvulling op de hierboven genoemde voorschriften a t/m d de volgende aanvullende voorschriften in acht genomen te worden:

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

Voor de werkzaamheden met de 5:3 reassortanten in associatie met muizen (kleine zoogdieren) dient in aanvulling op de hierboven genoemde voorschriften a t/m d het volgende aanvullende voorschrift in acht genomen te worden:

- Dieren worden gehuisvest in filtertopkooien.

Voor de werkzaamheden met de 5:3 reassortanten in associatie met fretten (grote zoogdieren) dient in aanvulling op de hierboven genoemde voorschriften a t/m d het volgende aanvullende voorschrift in acht genomen te worden:

- De huisvesting van en alle handelingen met de dieren vinden plaats in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Voor activiteiten met FACS apparatuur gelden tevens de aanvullende voorschriften opgenomen in Bijlage 9 van de Regeling ggo.

## 6. Conclusie

Samenvattend, gezien de attenuatie van de betreffende stammen 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.

## Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 29 oktober 2019)
2. 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
3. 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
4. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed. Pharmacother. 54: 196-209
5. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. Rev. Med. Virol. 11: 227-241
6. Ma W *et al.* (2015). Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. PLoS Pathog. 11: e1004819
7. Webster RG *et al.* (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 56: 152-179
8. Short KR *et al.* (2015). One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus.
9. Stevens J *et al.* (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. Science 303: 1866-1870
10. Reid AH *et al.* (1999). Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1651-1656
11. Goto H & Kawaoka Y (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human *Influenza A virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10224-10228
12. Kobasa D *et al.* (2004). Enhanced virulence of Influenza A viruses with the hemagglutinin of the 1918 pandemic virus. Nature 431: 703-707
13. COGEM (2015). Definities van verschillende varianten van Influenza A virus. COGEM advies CGM/151102-02
14. 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)) (bezocht: 4 november 2019)
15. World Health Organisation. Influenza (seasonal) fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (bezocht: 31 oktober 2019)
16. COGEM (2017). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus*. COGEM advies CGM/170712-01
17. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). LCI-richtlijn Influenza. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/influenza> (bezocht: 31 oktober 2019)
18. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advies CGM/040326-03
19. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02

20. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
21. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een ‘reverse genetics’ systeem. COGEM advies CGM/060724-03
22. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. COGEM advies CGM/061214-01
23. COGEM (2007). Aanvullende voorschriften bij handelingen met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. COGEM advies CGM/070328-01
24. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udm/307/72. COGEM advies CGM/100830-02
25. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01.
26. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04.
27. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
28. COGEM (2017). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Influenza A virus* met eiwitten van het humaan papillomavirus type 16. COGEM advies CGM/171127-01
29. Klimov AI *et al.* (2001). Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. International Congress Series 1219: 955-959
30. Isakova-Sivak I *et al.* (2011). Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology* 412: 297-305
31. Isakova-Sivak I *et al.* (2019). Sequential Immunization with Universal Live Attenuated Influenza Vaccine Candidates Protects Ferrets against a High-Dose Heterologous Virus Challenge. *Vaccines* 7: 61
32. Korenkov DA *et al.* (2018). Safety, immunogenicity and protection of A(H3N2) live attenuated influenza vaccines containing wild-type nucleoprotein in a ferret model. *Infect. Genet. Evol.* 64: 95-104