

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J. J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 21 september 2011
KENMERK CGM/110921-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden recombinant aviair influenzavirus H7N1

Geachte heer Atsma,

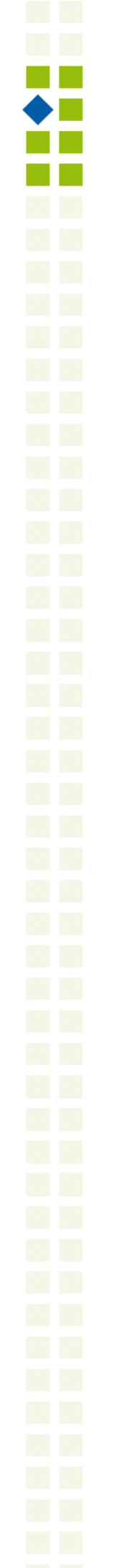
Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende de inschaling van werkzaamheden met recombinant aviair influenzavirus H7N1 aangevraagd door de faculteit diergeneeskunde van de universiteit van Utrecht deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg) aviair *Influenza A virus* (FLUAV), subtype H7N1. Het virus veroorzaakt vogelgriep en heeft een epidemie veroorzaakt in Italië waarbij van oorsprong laag pathogene stammen evolueerden naar hoog pathogene stammen. De epidemie heeft geen humane infecties veroorzaakt. De aanvrager wil de rol van dendritische cellen bij de afweer tegen infectie met vogelgriep bestuderen. Daartoe wil hij het wildtype virus vergelijken met gg-aviaire FLUAV stammen. De recombinante stammen zijn gebaseerd op het tijdens de epidemie verkregen klinische vogelgriepisolaat A/turkey/Italy/977/V99.

Influenza A virussen zijn geclassificeerd als klasse 3 pathogeen wat betekent dat werkzaamheden met gg-FLUAV onder ML-III inperking plaatsvinden. Gezien het vermeende laag pathogene karakter van de toegepaste 'backbone' virusstam stelt de aanvrager voor om werkzaamheden onder ML-II inperking te laten plaatsvinden.

De COGEM merkt op dat geen gegevens aangeleverd worden over de virulentie- of pathogeniteitskenmerken van de toegepaste virussen. Daardoor kan zij geen uitspraak doen over hun pathogeniteit. Tevens is A/turkey/Italy/977/V99 geen verzwakte laboratoriumstam. Daarom wordt niet voldaan aan de door COGEM gestelde voorwaarden die omlaagschaling van werkzaamheden met recombinant influenza virussen rechtvaardigen. Samengevat concludeert de COGEM dat de onder de aanvraag uit te voeren werkzaamheden met gg-A/turkey/Italy/977/V99 onder ML-III inperking dienen plaats te vinden. Met in acht neming van aanvullende voorschriften acht zij daarbij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



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

c.c. Dr. I. van der Leij
Drs. H.P. de Wijs

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden prof. dr. R.A.M. Fouchier en dr. R.J. de Groot niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling werkzaamheden recombinant aviair *Influenza A virus H7N1*

COGEM advies CGM/110921-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg) aviair influenzavirus H7N1. Het betreft een uitbreiding op een bestaande vergunning getiteld “Klonering en expressie van immunologische relevante eiwitten ter bestudering van auto-immuniteit en vaccins”. De vergunningsaanvraag is ingediend door de Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Departement Infectieziekten en Immunologie. De aanvrager is van mening dat de bij de vergunningsaanvraag betrokken aviaire gg-*Influenza A virussen* (gg-FLUAV) laag pathogeen zijn en acht, mede op grond van de aard van de werkzaamheden, inschaling van werkzaamheden met deze gg-virussen op ML-II inperkingsniveau gerechtvaardigd.

1.1 *Influenza virus*

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als het griepvirus, is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, influenza A, B en C. Alleen het FLUAV kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren.^{1,2} Het genoom van het FLUAV bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).^{1,2} Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.^{3,4}

Typering van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het FLUAV 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor. Bij de mens komen voor zover bekend alleen de H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1 en N2 subtypen voor.^{5,6,7}

1.2 *Pathogeniteit van FLUAV*

De pathogeniteit van FLUAV wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten die bijdragen aan de virulentie zijn het niet-structurele eiwit NS1, de polymerase eiwitten PA, PB1 en PB2 en de HA en NA eiwitten.^{2,4,8,9,10,11,12} Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong laag virulente virusstam virulent te maken.^{3,5,8,13} Het HA eiwit heeft een specifieke klievingplaats voor een cellulair protease. Voor de infectiviteit van het virus is het splitsen van het HA eiwit in HA1 en HA2 een belangrijke stap. Het betreffende protease is voornamelijk actief in epitheelcellen van de luchtwegen, waardoor deze cellen vatbaar zijn voor het virus. Een verandering van enkele aminozuren in een serie basische aminozuren in deze klievingplaats zorgt ervoor dat ook andere proteasen, die actief zijn in andere cellen, het HA eiwit kunnen klieven.^{5,8,13} Hierdoor verandert de specificiteit en gastheerbereik van het virus, maar ook de pathogeniteit.^{3,5,14} Uit de influenzavirusuitbraken in het verleden blijkt dat de aanwezigheid van een polybasische klievingplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing

is voor de pathogeniteit van het virus.^{15,16} Dit kenmerk is echter niet aanwezig in de hoogpathogene influenzastam uit 1918, die verantwoordelijk is voor de Spaanse griep.^{17,18,19,20}

1.3 Vogelgriep

Aviaire influenza of vogelgriep wordt veroorzaakt door FLUAV. Wilde vogels vormen primair de bron van alle subtypen.²¹ Verondersteld wordt dat het merendeel van de FLUAV isolaten die worden gevonden bij andere dieren, zoals varkens en paarden, of bij de mens, oorspronkelijk van aviaire herkomst zijn.²² De meeste stammen veroorzaken bij vogels asymptomatische of milde infecties en worden beschouwd als laag pathogeen. Sommige stammen evolueren tot hoog pathogene aviaire influenza (HPAI) virussen. Het virus is zeer besmettelijk voor kippen en kalkoenen, maar ook parelhoenders, eenden, ganzen, kwartels, duiven, fazanten, patrijzen en loopvogels (struisvogels) zijn vatbaar.¹ Verspreiding vindt plaats door intensief contact met besmet pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en via kleine deeltjes door de lucht. Buiten de gastheer blijft het virus bij lage temperaturen voor enkele maanden infectieus. Het virus kan vernietigd worden bij een temperatuur van 56°C of hoger, en met desinfectiemiddelen zoals formaline.²³

De eerste vogelgriepepidemie is in 1878 in Italië beschreven. Een zeer besmettelijke virusstam veroorzaakte een mortaliteit onder vogels van ongeveer 100%.²⁴ Epidemieën komen regelmatig voor en kunnen aanzienlijke economische schade in de pluimveehouderij veroorzaken.^{25,26,27,28}

1.4 Vogelgriep en humane pathogeniteit

Mensen kunnen door het aviaire FLUAV geïnfecteerd worden. Besmetting vindt plaats via nauw contact met besmette gevogelte, niet door consumptie.²⁹ Tijdens de vogelgriep in Hongkong van 1997 zijn 18 mensen met subtype H5N1 geïnfecteerd, hiervan zijn 6 mensen overleden.^{30,31} Sinds 2003 wordt dit subtype in geheel Zuid-Oost Azië en Egypte gesignaleerd. Tot nu toe is het virus bij 564 mensen waargenomen en zijn 330 mensen overleden.³² Tijdens de vogelgriepepidemie in Nederland in 2003 veroorzaakte het subtype H7N7 bij een gedeelte van de blootgestelde mensen oogontsteking met in één geval een dodelijke afloop.^{27,28} Een vogelgriepepidemie met subtype H7N3 in 2003 in Italië toonde bij mensen die beroepshalve veelvuldig met het besmette pluimvee in aanraking waren gekomen anti-H7 antistoftiters aan wat aangeeft dat aviaire-humane transmissie mogelijk is.³³

1.5 Aviair influenzavirus H7N1

In 1999-2000 heeft in Italië een vogelgriepepidemie met FLUAV subtype H7N1 plaatsgevonden. Tijdens de epidemie evolueerde een laag pathogene stam tot een hoog pathogene variant waarbij de aanvankelijk enkelvoudige klievingplaats in het HA veranderde in een polybasische klievingplaats. Door de dood van meer dan 13 miljoen vogels leidde de epidemie tot aanzienlijke economische schade in de pluimveehouderij.^{25,26} Bij deze epidemie zijn geen humane besmettingen gesignaleerd. Een analyse van serummonsters van mensen die tijdens deze epidemie beroepshalve in aanraking waren gekomen met het virus lieten geen positieve antistoftiter tegen het virus zien.³³

2. Eerder COGEM advies

In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van het FLUAV.³⁴ De COGEM heeft destijds geadviseerd om alle FLUAV stammen, inclusief de laag pathogene stammen, zowel met aviair als niet-aviair tropisme, in te delen in pathogeniteitsklasse 3, aangezien laag pathogene FLUAV stammen in staat zijn op een relatief eenvoudige manier te evolueren naar hoog pathogene stammen. Bovendien vormen deze virussen een potentieel gezondheidsrisico voor mens én dier, en zijn zij zeer besmettelijk voor verschillende vogelsoorten. Deze classificatie heeft als gevolg dat werkzaamheden met gg-virus minimaal uitgevoerd dienen te worden op ML-III of DM-III niveau, waarbij afhankelijk van het type werkzaamheden aanvullende voorwaarden gesteld kunnen worden zoals adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen.

In het verleden heeft de COGEM diverse malen geadviseerd over eventuele omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV. Voor bepaalde verzwakte gg-influenzavirus stammen (rech1N1, rech2N2, rech3N2, rech5N1 en rech7N7) werd omlaagschaling naar ML-II inperkingsniveau mogelijk geacht mits daarbij aanvullende voorschriften in acht werden genomen.^{35,36,37,38,39,40} De recombinanten waren gebaseerd op voor mensen sterk geattenueerde en avirulente virussen die ondermeer worden toegepast in vaccins zoals Port Chalmers 1 (PC1), Puerto Rico 8 (PR8) en WSN 33. Voor al deze verzwakte gg-influenza A stammen gold dat de 'polybasische klievingplaats' in het HA ontbrak. Samengevat heeft de COGEM gesteld dat er aan drie voorwaarden moet worden voldaan voordat zij adviseert dat laboratoriumwerkzaamheden met gg-FLUAV stammen op ML-II inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden.⁴⁰ Deze voorwaarden zijn:

- het gg-FLUAV bestaat uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen,
- de heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd,
- voor heterologe HA-coderende gensegmenten geldt dat de aanwezigheid van een 'polybasische klievingplaats' is uitgesloten.

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-FLUAV stammen onder ML-III inperking.³⁷ Zij heeft gesteld dat verspreiding dient te worden tegen gegaan en contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden. Om deze reden heeft zij geadviseerd dat:

- open handelingen plaatsvinden in een klasse-II veiligheidskabinet
- medewerkers gevaccineerd dienen te zijn
- medewerkers met griepsymptomen uitgesloten dienen te worden van deelname aan de werkzaamheden
- het dragen van handschoenen verplicht is
- bij werkzaamheden met H7 gg-influenzavirussen een beschermende bril verplicht is
- het dragen van een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) verplicht is

De COGEM is van mening dat de combinatie van al de hierboven genoemde factoren de kans op verspreiding van gg-FLUAV en de daarmee geassocieerde kans op 'reassortment' (uitwisseling van genoomsegmenten tussen wildtype virus en gg-virus) reduceert en daarmee de kans op het optreden van een onbedoelde infectie en vermenigvuldiging van het gg-virus, en de risico's als gevolg hiervan, verwaarloosbaar klein zijn.

3. Werkzaamheden met gg-FLUAV subtype H7N1

De aanvrager wil de rol van dendritische cellen bij de afweer tegen infectie met aviaire influenza bestuderen. Daartoe wil hij wildtype vogelgriepvirus vergelijken met gg-FLUAV door het 'niet-structurele eiwit 1' (NS1) van het wildtype virus te vervangen door het NS1 van donorvirussen. Volgens de aanvrager onderdrukt, na infectie met een influenza virus, het NS1 eiwit de interferonproductie waardoor de afweerreactie tegen het virus minder goed verloopt. De aanvrager denkt dat dendritische cellen een belangrijke rol bij dit proces spelen en wil daarom hun bijdrage hieraan onderzoeken.

3.1 Toegepaste virusstammen

De 4 genetisch gemodificeerde virusstammen die de aanvrager gaat gebruiken, zijn allen afgeleid van het aviaire FLUAV A/TK/Italy/977/V99. Deze stam (subtype H7N1) is geïsoleerd tijdens de vogelgriep epidemie in Italië van 1999/2000.^{25,26} De aanvrager geeft aan dat de stam laag pathogeen is omdat de polybasische klievingplaats in het HA ontbreekt.

De gg-H7N1 stammen zijn niet zelf geconstrueerd maar verkregen van het 'National Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease' te Padua, Italië. Vervaardiging heeft middels 'reverse genetics' plaatsgevonden door cotransfectie van een complete set genoomsegmenten in animale cellen.⁴¹ Van de recombinante A/turkey/Italy/977/V99 virussen is het autologe NS1 gen vervangen door 4 verschillende varianten, elk afkomstig van een ander donorvirus. De donorvirussen, A/CK/Pakistan/447/95, A/CK/Pakistan/447/95mut*, A/TK/Italy/4426/00 en A/CK/Italy/3981/07, zijn eveneens aviaire FLUAV isolaten en afkomstig uit Pakistan en Italië. De aanvrager levert geen gegevens aan over de pathogeniteit van deze donorvirussen. De NS1 eiwitten van de Italiaanse stammen zijn ongeveer 230 aminozuren lang, het NS1 eiwit van de Pakistaanse stam is 217 aminozuren lang. Door middel van 'site directed mutagenesis' is van deze Pakistaanse stam een mutant gemaakt met een NS1 van 230 aminozuren (A/CK/Pakistan/447/95mut*). Sequentie-analyse heeft bevestigd dat de 4 recombinante virussen geen polybasische klievingplaats in het HA bevatten en dat de enkelvoudige klievingplaats identiek is aan die van het 'backbone' virus A/turkey/Italy/977/V99.

3.2 Handelingen met gg-H7N1

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial) cellen en primaire dendritische cellen (kip) zullen met wildtype virus of de 4 verschillende gg-H7N1 mutanten geïnfecteerd worden. Vervolgens zal infectie, na fixatie met paraformaldehyde, door middel van FACS-analyse getest worden. Cytokineproductie van de cellen zal middels reporter assays en kwantitatieve PCR gemeten worden. De aanvrager heeft niet het voornemen mutanten te kweken en gg-viruspartikels te produceren of om deze in proefdieren te gebruiken.

Wegens de afwezigheid van de polybasische klievingplaats in het HA van het in de mutanten toegepaste 'backbone' virus en daardoor het veronderstelde laag pathogene karakter van deze stammen, is de aanvrager van mening dat werkzaamheden onder ML-II inperking uitgevoerd kunnen worden. Als aanvullende maatregelen geeft hij aan een labjas en handschoenen te zullen dragen. Daarnaast zal een quarantaine maatregel van 72 uur in acht genomen worden. In deze periode zal de medewerker geen contact met vogels hebben en zal er geen bezoek aan kinderboerderij, dierentuin, pluimveehouderij of broederij plaatsvinden.

4. Overweging en advies

In beginsel worden laboratoriumhandelingen met gg-FLUAV op grond van de pathogeniteitsklasse van het FLUAV (klasse 3) ingeschaald op ML-III inperkingsniveau.³⁴ Echter, voor werkzaamheden met gg-influenza virussen kan onder bepaalde voorwaarden een lagere inperking worden gehanteerd.⁴⁰ De aanvrager geeft aan dat voor de werkzaamheden met gg-H7N1 laag pathogeen virus wordt gebruikt. Hij verwijst daarbij naar literatuur waarin de herkomst van de toegepaste 'backbone' virusstam beschreven wordt. Donorvirusstammen toegepast bij de vervaardiging van de 4 gg-H7N1 mutanten zijn aangegeven. Aminozuursequentiegegevens van het HA van de 'backbone' virusstam en daarvan afgeleide mutanten, alsmede de lengtes van de verschillende heterologe NS1 eiwitten van de toegepaste donorvirussen zijn aangeleverd. De gegevens laten zien dat een polybasische klievingplaats in het HA afwezig is. De aanvrager geeft aan dat de 4 gg-H7N1 stammen volledig gesequenced zijn.

4.1 Inschaling werkzaamheden

De COGEM merkt op dat geen gegevens noch referenties aangeleverd worden over de biologische kenmerken (zoals virulentie of pathogeniteit) van de uitgangsvirusstam A/turkey/Italy/977/V99, noch van de 4 toegepaste donorvirussen. Zo ontbreken bijvoorbeeld gegevens over de 'intraveneuze pathogeniteitsindex' (IVPI). Ook zijn geen gegevens aangeleverd waarin de constructie of typering van verkregen mutanten bevestigd wordt. De COGEM is van mening dat de aanvrager onvoldoende informatie en onderbouwing heeft aangeleverd op grond waarvan zij kan staven wat de pathogeniteitskenmerken van uitgangsvirusstam A/turkey/Italy/977/V99 zijn. De COGEM wijst erop dat niet wordt tegemoetgekomen aan de eerste van de drie voorwaarden die zij gesteld heeft voor omlaagschaling van werkzaamheden met gg-FLUAV: A/turkey/Italy/977/V99 is geen niet-virulente verzwakte laboratoriumstam. De stam is een klinisch vogelgriepisolaat en is bijvoorbeeld niet geattenuëerd door middel van veelvuldige celpassages.

Tijdens de epidemie van 1999/2000, toen A/turkey/Italy/977/V99 geïsoleerd is, is laag pathogeen aviëris influenza (LPAI) virus H7N1 geëvolueerd naar HPAI H7N1 virus doordat het HA met enkelvoudige klievingplaats gemuteerd is naar een HA met een polybasische klievingplaats.^{25,26} De aanvrager geeft aan dat de voor de werkzaamheden benodigde MDCK- en primaire dendritische cellen (kip) met (gg)-H7N1 geïnfecteerd zullen worden. De toegepaste celkweeksystemen zullen niet gebruikt worden voor de kweek of productie van (gg)-H7N1. Daardoor is er volgens de aanvrager geen risico op het ontstaan van mutaties in de klievingplaats van het HA. De COGEM merkt op dat aviëris influenza virussen zich kunnen repliceren in MDCK-cellen. Dit is de standaard cellijn voor het kweken van influenzavirussen.² Ook replicatie

in dendritische cellen is mogelijk maar de efficiëntie lijkt virusafhankelijk. Hoewel de COGEM het optreden van mutaties tijdens replicatie in de gebruikte celkweeksystemen ter hoogte van de klievingplaats uiterst klein acht, kan zij dit niet uitsluiten. Daardoor kan zij niet uitsluiten dat tijdens de werkzaamheden HPAI kan ontstaan.

De aanvrager geeft aan dat de recombinante virussen met heterologe NS1 eiwitten 'waarschijnlijk de afweerreactie tegen A/turkey/Italy/977/V99 zullen verbeteren waardoor de gg-FLUAV stammen in virulentie en/of fitness zullen afnemen'. Het is de COGEM onduidelijk op welke argumenten deze hypothese gebaseerd is. De COGEM wijst erop dat het NS1 eiwit bijvoorbeeld ook in verband wordt gebracht met cytokine disregulatie wat tot een eventuele 'cytokine storm' kan leiden. De gevolgen van een dergelijke heftige immunreactie kunnen, wegens de aangerichte onherstelbare schade aan vitale organen, fataal zijn voor de geïnfecteerde gastheer. Op grond van de aangeleverde gegevens betreffende de aminozuurlengtes van de verschillende NS1 eiwitten kan naar de mening van de COGEM niet op voorhand verhoging of verlaging van virulentie en/of fitness voorspeld worden. Juist de resultaten van de voorgenomen werkzaamheden zullen dit moeten aantonen.

Samengevat is de COGEM van mening dat voor laboratoriumhandelingen met H7N1 recombinanten op grond van de pathogeniteitsklasse van het FLUAV, namelijk klasse 3, ML-III inschaling van toepassing is. De aanvrager onderbouwt onvoldoende dat de pathogeniteit van de recombinanten vergelijkbaar is met de pathogeniteit van niet-virulente of verzwakte laboratoriumstammen zoals PR8 en WSN.

4.2 Aanvullende voorschriften

De COGEM stelt dat verspreiding van het aviaire gg-FLUAV dient te worden tegen gegaan en dat contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden om zo de kans op het optreden van een onbedoelde infectie en vermenigvuldiging van het gg-virus en de kans op het optreden van 'reassortment' te reduceren. Hoewel de medewerkers handelingen uitvoeren in een klasse-II veiligheidskabinet kan de COGEM niet uitsluiten dat gg-virus hieruit vrij komt. Daarom adviseert zij, conform de adviezen die zij in het verleden heeft opgesteld, dat:

- open handelingen plaatsvinden in een klasse-II veiligheidskabinet
- het dragen van handschoenen verplicht is
- het dragen van een beschermende bril verplicht is omdat H7 influenzavirussen ooginfecties kunnen veroorzaken
- het dragen van een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) verplicht is. Op deze wijze wordt de kans op besmetting verder gereduceerd.
- medewerkers gevaccineerd dienen te zijn met humaan FLUAV om te voorkomen dat 'reassortment' kan optreden met wildtype FLUAV waarvan de medewerker drager is
- medewerkers met griepsymptomen uitgesloten dienen te worden van deelname aan de werkzaamheden

Indien werkzaamheden onder ML-III inperking plaatsvinden en voornoemde aanvullende voorschriften in acht worden genomen, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en

milieu verwaarloosbaar klein zijn. Onder deze voorwaarden acht zij het niet noodzakelijk dat aanvullende quarantainemaatregelen, dat wil zeggen de eerste 72 uur geen contact met vogels en geen bezoek aan kinderboerderij, dierentuin, pluimveehouderij of broederij, in acht worden genomen.

5. Conclusie

De COGEM is van mening dat de aanvrager onvoldoende onderbouwing heeft aangeleverd die inschaling van werkzaamheden met laag pathogeen gg-H7N1 A/turkey/Italy/977/V99 onder ML-II inperking rechtvaardigen. Zij adviseert daarom deze werkzaamheden onder ML-III inperking uit te voeren en aanvullende voorschriften, waaronder het verrichten van open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet, in acht te nemen maar vindt quarantainemaatregelen van medewerkers daarbij niet noodzakelijk. Indien de werkzaamheden onder voornoemde voorwaarden worden uitgevoerd acht zij de kans op onbedoelde infectie, vermenigvuldiging en verspreiding van het gg-virus, alsmede de kans op het optreden van 'reassortment' en de daarmee gepaard gaande risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Kawaoka Y *et al.* (2005). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses, family *Orthomyxoviridae*. In: Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Fauquet CM *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam. 681-687
2. Wright PF and Webster RG (2001). Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, volume 1, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 1533-1579
3. Brown, EG (2000). Influenza virus genetics. Biomed Pharmacother 54: 196-209
4. Zambon, MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. Rev Med Virol 11: 227-41
5. Flint, SJ *et al.* (2004). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, D.C.
6. Lewis, DB (2006). Avian flu to human influenza. Annu Rev Med 57: 139-154
7. Belser JA *et al.* (2009). Past, present, and possible future human infection with *Influenza A virus* subtype H7. Review Em Inf Dis 15(6): 859-865
8. Hatta, M *et al.* (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 *Influenza A viruses*. Science 293: 1840-1842
9. Webster, RG *et al.* (1992). Evolution and ecology of *Influenza A viruses*. Microbiol Rev 56: 152-179
10. Matrosovich, M *et al.* (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol 74: 8502-8512
11. Kobasa, D *et al.* (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the *Influenza A virus* neuraminidase. J Virol 73: 6743-6751
12. Seo, SH *et al.* (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. Nat Med 8: 950-954
13. Horimoto, T en Kawaoka, Y (2001). Pandemic threat posed by avian *Influenza A viruses*. Clin Microbiol Rev 14: 129-149
14. Ito, T *et al.* (2001). Generation of a highly pathogenic avian *Influenza A virus* from an avirulent field isolate by passaging in chickens. J Virol 75: 4439-4443

15. Garten W and Klenk HD (1999). Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends in Microbiology* 7(3):99-100
16. Perdue MI. (2008). Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In: *Avian influenza*. Edited by Swayne DE, Blackwell Ames IA, 23-41
17. Stevens, J *et al.* (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303: 1866-1870
18. Reid, AH *et al.* (1999). Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1651-1656
19. Goto, H en 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
20. Kobasa, D *et al.* (2004). Enhanced virulence of *Influenza A viruses* with the hemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431: 703-707
21. Centers for Disease Control and Prevention, Internet (19-09-2011) <http://www.cdc.gov/flu/avian/>
22. Zhou, NN *et al.* (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human *Influenza A viruses* in American pigs. *J Virol* 73, 8851-8857
23. Avian Influenza, Office International des Epizooties (OIE), Internet (19-09-2011) http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.10.4.htm
24. Lupiani B and Reddy SM (2009). The history of avian influenza. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32(4): 311-323
25. Capua I *et al.* (2002). The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: Veterinary and human health implications. *Acta tropica* 83: 7-11
26. Mutinelli F *et al.* 2003. Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. *Avian Diseases* 47: 844-848
27. Koopmans M *et al.* (2004). Transmission of H7N7 avian *Influenza A virus* to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363, 587-593
28. Fouchier RAM *et al.* (2004). Avian *Influenza A virus* (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1001: 1356-1361
29. World Health Organization (WHO), Internet (15/09/2011) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html
30. Shortridge KF *et al.* (2000). A review of interspecies transmission of influenza viruses: The Hong Kong perspective. *Veterinary Microbiology* 74:141-147
31. Claas, E *et al.* (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-477
32. World Health Organization (WHO), Internet (15/09/2011) http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_08_09/en/index.html
33. Puzelli S *et al.* (2005). Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *JID* 192: 1318-1322
34. COGEM (2004). Advies *Influenza A virus*. COGEM advies CGM/040326-03
35. COGEM (2006). Ontwikkeling van influenza virus m.b.v. een reverse genetics systeem (IG 06-041). COGEM advies CGM/060724-03

36. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04
37. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-*Influenza A virussen*. COGEM advies CGM/061214-01
38. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01
39. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
40. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advies CGM/100830-02
41. Hoffman E *et al.* (2002). Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20:3165-3170