

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 24 juli 2006
KENMERK CGM/060724-04
ONDERWERP Advies handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld “Laag pathogene H5N1 vaccinstam voor serologisch onderzoek” van het RIVM te Bilthoven, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met een recombinant influenza A virus. Het virus is gebaseerd op de niet-virulente verzwakte vaccinstam A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Aan deze stam zijn de genoomsegmenten H5 en N1, afkomstig van een hoog pathogene influenza stam, toegevoegd. Met dit recombinante H5N1 virus (rec-H5N1) wil de aanvrager bepalen of mensen na blootstelling aan wildtype H5N1 antistoffen hebben gevormd in hun serum. De aanvrager wil de experimenten uitvoeren op inperkingsniveau ML-II.

Rec-H5N1 is verminderd virulent, omdat onder andere de basische klievingplaats van H5 afwezig is en de basis van het virus een verzwakte vaccinstam vormt.

Risico's met deze laagpathogene stam zouden kunnen ontstaan wanneer wildtype H5N1 virus (wt-H5N1) aanwezig is in het patiëntenserum. Mogelijk zou na samenvoegen van het serum en rec-H5N1, in aanwezigheid van cellen waarin de virussen zich kunnen repliceren, recombinatie tussen de virussen kunnen optreden. Dit zou theoretisch tot nieuwe virussen kunnen leiden. De COGEM acht de kans op recombinatie bij de beoogde werkzaamheden echter verwaarloosbaar klein. De kans dat wt-H5N1 aanwezig is in patiëntenserum is namelijk verwaarloosbaar klein, mede doordat eventueel aanwezig wt-H5N1 in het serum volledig geïnactiveerd wordt door een hitte-behandeling.

Gezien dit alles, kunnen de werkzaamheden met influenzavirussen volgens de COGEM op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. Wel dienen aanvullende maatregelen in acht genomen te worden, waaronder het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. R.C. Zwart

Handelingen met een laag pathogene H5N1 influenza stam en serologisch onderzoek

COGEM advies CGM/060724-04

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met een genetisch gemodificeerd influenza A virus. Dit virus bestaat uit twee genoomsegmenten afkomstig van de hoog pathogene aviaire stam Indo/05/2005 (H5N1) en zes genoomsegmenten van de niet-virulente verzwakte vaccinstam A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1). Met dit recombinante H5N1 (rec-H5N1) virus wil de aanvrager serologisch bepalen of mensen na blootstelling aan wildtype H5N1 (wt-H5N1) antistoffen hebben gevormd. De aanvrager wil deze werkzaamheden uitvoeren op inperkingsniveau ML-II.

Influenza A virussen

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus en wordt van persoon tot persoon overgedragen door onder andere hoesten of niezen. Het is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, Influenza A, B en C (1;2). Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). De HA en NA eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (3).

Classificatie van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus* 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor, terwijl bij de mens voor zover bekend H1, H2, H3, N1, N2 voorkomen. Recentelijk blijkt dat ook H5, H7 en H9 bij de mens tot infecties kunnen leiden (4;5).

De pathogeniteit van influenza A virussen wordt bepaald door een aantal factoren, waaronder het HA eiwit. Het HA eiwit wordt door een cellulair protease (trypsin-like serine endoprotease) gesplitst op een specifieke klievingsplaats tussen het HA1 en HA2 domein bestaande uit een enkel basisch aminozuur. Klieving van het eiwit in HA1 en HA2 vormt een belangrijke stap voor de pathogeniteit van het virus. Aangezien het betreffende protease voornamelijk actief is in epitheelcellen van de luchtwegen, zijn deze cellen vatbaar voor het virus.

Door een insertiemutatie van enkele aminozuren in de klievingplaats, kan een polybasische klievingsplaats ontstaan. Hierdoor kunnen ook andere proteasen (PC1 en furine), die actief zijn in cellen in het hele lichaam, het HA eiwit klieven. Dit leidt ertoe dat weefsels in het gehele lichaam geïnfecteerd kunnen raken, met als gevolg een veranderde specificiteit, pathogeniteit en gastheerbereik van het virus (5;6). Uit influenzavirusuitbraken in het verleden blijkt de aanwezigheid van een dergelijke polybasische klievingsplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing te zijn voor de pathogeniteit van het virus.

Vogels die geïnfecteerd raken met influenza A virussen (aviaire influenza A) maken doorgaans asymptomatische of milde infecties door. Wanneer overdracht plaatsvindt van wilde watervogels naar pluimvee, kunnen sommige virusstammen evolueren tot hoogpathogene influenzavirussen. Oorzaken hiervan zijn mutaties en uitwisseling van genoomsegmenten tussen influenzavirussen. Aangezien een influenzavirus bestaat uit acht verschillende genoomsegmenten, kunnen er uit twee typen influenzavirussen theoretisch 256 (2^8) unieke combinaties gevormd worden. Dit kan tot gevolg hebben dat een pathogeen influenzavirus ontstaat met geheel nieuwe eigenschappen en oppervlakte eiwitten, waartegen in de populatie geen antistoffen aanwezig zijn. Vermenging van een niet-virulent humaan influenzavirus met een pathogeen aviair influenzavirus kan leiden tot het ontstaan van een pathogeen humaan influenzavirus (5).

In het verleden zijn diverse hoogpathogene influenza virussen ontstaan. Recentelijk is het hoogpathogene subtype H5N1 waargenomen in Zuid-Oost Azië, Rusland, Turkije, Roemenië, Kroatië, Iran en Nigeria. Sinds februari van dit jaar is het betreffende virus geconstateerd in een aantal lidstaten van de Europese Unie (EU), waaronder Italië, Frankrijk en Spanje. In de EU waren per 12 juli nog geen mensen besmet geraakt, maar in Turkije zijn vier van de twaalf geïnfecteerde personen overleden (7;8).

Het aviaire influenzavirus wordt verspreid door intensief contact met besmet pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en geïnfecteerde (trek)vogels en via kleine stofdeeltjes door de lucht (4;5;9). Mensen kunnen besmet raken met het H5N1 influenzavirus, maar tot op heden zijn er geen aanwijzingen dat het virus zich efficiënt kan verspreiden van mens op mens. Indien het virus door mutatie van mens op mens kan verspreiden zou een wereldwijde pandemie kunnen ontstaan. Het is de verwachting dat niet alleen jonge kinderen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem ziek worden, maar ook gezonde volwassenen aangezien er weinig immuniteit onder het grootste deel van de wereldbevolking heerst tegen het H5 eiwit. (5;9).

Eerder COGEM advies

In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van influenza A virussen (CGM/040326-03). De COGEM heeft destijds geadviseerd om voor ggo activiteiten alle influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3, aangezien influenza A virussen in staat zijn om op een relatief eenvoudige manier te adapteren tot hoogpathogene stammen én omdat deze virussen een potentieel gezondheidsrisico voor mens en dier zijn. Deze indeling houdt onder andere in dat ggo activiteiten met het virus minimaal ingeschaald worden op ML-III of DM-III niveau, waarbij afhankelijk van het type werkzaamheden aanvullende eisen gesteld kunnen worden zoals ademhalingsbescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen (10).

De COGEM heeft vorig jaar over een aanvraag geadviseerd (CGM/050201-01), waarbij onder andere recombinante virussen geproduceerd werden op basis van het geattenueerde influenzavirustype PR8 (H1N1) (11). Het betrof de vervaardiging van recombinante virussen bestaande uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam, zoals PR8, in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen. De aanvrager heeft destijds aangegeven dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat en dat in de heterologe genoomsegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht zijn.

De COGEM heeft geadviseerd dat de productie van de recombinante influenza A virussen, de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en de handelingen met cellen en weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *Influenza A virus*;
- medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen is verplicht;
- het dragen van een mondkapje (model N95 of hogere specificatie) en een beschermende bril is verplicht.

Adviesvraag

Het doel van het onderzoek is het meten van antistoffen tegen wt-H5N1 in serum van eventueel besmette personen. De aanvrager geeft aan dat rec-H5N1 en het wt-H5N1 homoloog zijn voor het H5 eiwit waardoor rec-H5N1 bruikbaar is om antistoffen tegen wt-H5N1 te bepalen.

Rec-H5N1 is gebaseerd op de laag-virulente verzwakte stam PR8 waarin twee genoomsegmenten, H5 en N1, afkomstig van de hoog pathogene influenza stam Indo/05/2005 geplaatst zijn. Overigens is de basische klievingsplaats verwijderd uit het H5 gen zodat de pathogeniteit verminderd is. De vervaardiging van rec-H5N1 maakt geen onderdeel uit van de vergunningaanvraag.

Alvorens rec-H5N1 kan worden toegepast voor serologisch onderzoek, wordt het virus opgegroeid in 'Madin-Darby canine kidney' (MDCK) cellen, Vero-cellen en/of apennier-cellen. Hierna wordt de virusstock gebruikt voor een virus-neutralisatie-assay, een hemagglutinatiesassay en een hemagglutinatieremmingsassay. Deze assays worden hieronder kort beschreven.

Virus-neutralisatieassay

Het doel van deze assay is het aantonen van de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen wt-H5N1 in patiëntenserum. Serum afkomstig van met wt-H5N1 geïnfecteerde patiënten wordt gedurende twee uur bij 37°C gemengd met rec-H5N1. Dit mengsel wordt op MDCK-cellen gebracht en gedurende twee uur geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens wordt het serum-virus mengsel verwijderd en vervangen door een groei medium waaraan trypsine is toegevoegd. Na 18 uur incubatie worden de cellen gefixeerd, waardoor de virussen geïnactiveerd worden, en wordt microscopisch bepaald of de cellen geïnfecteerd zijn of dat de eventueel aanwezige antistoffen in het patiëntenserum een infectie met rec-H5N1 hebben voorkomen. De microscoop bevindt zich in een ML-II ruimte.

Hemagglutinatie assay en hemagglutinatieremmingsassay

Met deze assay wordt getracht de hoeveelheid antistoffen gericht tegen wt-H5N1 te bepalen. Ook voor deze assay wordt serum afkomstig van met wt-H5N1 geïnfecteerde patiënten gemengd met rec-H5N1. Na een incubatieperiode van één uur bij 37°C, worden rode bloedcellen (afkomstig van paard) toegevoegd, waarna incubatie wederom één uur bij 37°C plaatsvindt. Indien hierna nog actief rec-H5N1 aanwezig is in het serum, zal dit met de rode bloedcellen samenklonteren (hemagglutinatie) en een netwerk vormen dat macroscopisch te zien is. Wanneer geen actief rec-H5N1 aanwezig is, slaan de rode bloedcellen neer.

Voor beide assays geldt dat alle sera verhit worden om eventueel aanwezig wt-H5N1 te inactiveren. De aanvrager heeft deze methode gevalideerd. Voor de bepaling is kippenserum besmet met een Chinese wt-H5N1 (titer is 1×10^6 virusdeeltjes/ml) waarna verhitting gedurende verschillende tijdsperiodes plaatsvindt. Uit de aangeleverde data

blijkt dat een volledige virusinactivatie optreedt bij verhitting gedurende 15 minuten bij 56°C. De aanvrager geeft aan de sera 30 minuten te verhitten.

Naast deze assays zal een deel van de virusstock tevens geïnactiveerd worden met een guanidine/triton lysis buffer waarna het materiaal zal dienen als een positieve controle voor PCR. Deze methode van inactiveren is bewezen effectief en het influenza virus is gevoelig voor inactivatie met de genoemde buffer.

De aanvrager wil beschreven handelingen uitvoeren op ML-II niveau. De COGEM is gevraagd hierover te adviseren.

Overweging en advies

Tijdens de werkzaamheden zouden risico's kunnen ontstaan wanneer rec-H5N1 hoogpathogeen is en wanneer wt-H5N1 aanwezig is in het patiëntenserum. In deze laatste situatie zou namelijk recombinatie tussen wt-H5N1 en rec-H5N1 kunnen optreden als cellen waarin de virussen zich kunnen repliceren aanwezig zijn. Dit is het geval bij de virus-neutralisatieassay, waar MDCK-cellen gebruikt worden. In de hemagglutinatiesassay en de hemagglutineremmingsassay worden rode bloedcellen gebruikt. Influenzavirussen zijn niet in staat om te repliceren in dergelijke cellen, zodat recombinatie bij deze experimenten uit te sluiten is. Recombinatie zou theoretisch kunnen leiden tot een hoog pathogeen humaan replicatiecompetent virus.

Om de risico's te kunnen inschatten, worden enkele aspecten in ogenschouw genomen. Ten eerste wordt de pathogeniteit van rec-H5N1 beoordeeld. Ten tweede wordt bepaald of de door de aanvrager gehanteerde methode ter inactivatie van wt-H5N1 in serum effectief is. In de risicoanalyse wordt verder rekening gehouden met de kans dat wt-H5N1 daadwerkelijk aanwezig is in serum van met influenza besmette personen. Daarnaast wordt de kans op recombinatie van wt-H5N1 en rec-H5N1 meegenomen in de overweging.

Rec-H5N1 is verminderd pathogeen

Het recombinante influenzavirus is gebaseerd op de verzwakte virusstam PR8. Van deze vaccinstam is mede op grond van literatuurgegevens bekend dat deze avirulent en sterk geattenuëerd is voor mensen (12;13;14;15). Eerdere experimenten hebben aangetoond dat recombinante virussen, die bestaan uit zes genoomsegmenten van PR8 en twee genoomsegmenten van het HA en NA van andere wildtype humaan influenza virussen, niet virulent zijn voor mensen (15). Daarnaast draagt het verwijderen van de basische klievingplaats in het HA eiwit van het rec-H5N1 influenzavirus tevens bij aan een drastische vermindering van de pathogeniteit voor mensen (16).

De Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) heeft aangegeven dat recombinante virussen, bestaande uit zes genoomsegmenten van PR8, het NA gen van het H5N1 virus en het HA gen zonder de basische aminozuren van het H5N1 virus, niet pathogeen zijn. De WHO merkt hierbij echter op dat er een geringe kans bestaat dat indien uitwisseling van genoomsegmenten optreedt tussen een recombinant influenzavirus en wildtype humane influenzavirussen dit kan leiden tot een humaan replicatiecompetent virus. In een uitzonderlijke situatie kan uitwisselen van genoomsegmenten leiden tot een volledig aan de mens aangepast virus en resulteren in een pandemie (14;15).

De COGEM is van mening dat de gehanteerde recombinante stam laag pathogeen is omdat zes genoomsegmenten afkomstig zijn uit de voor mensen laagpathogene PR8 stam en omdat daarnaast de polybasische klievingsplaats van het HA eiwit verwijderd is.

Methoden voor inactivatie van wildtype H5N1 in serum is effectief

Over het algemeen veroorzaken influenzavirussen aandoeningen aan de luchtwegen en wordt het virus slechts zelden geïsoleerd uit andere weefsels (17). De aanwezigheid van influenzavirussen in het bloed, viremie, wordt daarom zeldzaam geacht (17;18). Tot nu toe zijn er in de literatuur sporadisch gevallen van patiënten met een viremie beschreven (17;18;19). Overigens trad de viremie in bijna alle gevallen op tijdens de incubatieperiode of tijdens de eerste 48 uur van ziekte (17).

Indien in een uitzonderlijke situatie wt-H5N1 aanwezig is in patiëntenserum zou eventueel recombinatie met rec-H5N1 kunnen optreden bij gelijktijdige incubatie op influenzavirus gevoelige cellen. Om dit te voorkomen, wordt wt-H5N1 in serum geïnactiveerd door een hitte-behandeling.

Uit de door de aanvrager aangeleverde data, blijkt dat de inactivatie van wt-H5N1 effectief is bij verhitting (56°C) gedurende minimaal 15 minuten. Deze incubatie brengt een reductiefactor van 1×10^6 virusdeeltjes/ml teweeg. Als controle is hetzelfde experiment uitgevoerd bij een temperatuur van 4°C. Hieruit blijkt dat gedurende periodes tot één à twee uur nauwelijks een titerreductie plaatsvindt. De aanvrager vermeldt het serum 30 minuten te verhitten.

De validatie-experimenten zijn uitgevoerd met een Chinese influenza stam en kippenserum. De COGEM is van mening dat de resultaten van deze experimenten vergelijkbaar zijn voor humaan serum en rec-H5N1. Er bestaat slechts een gering fylogenetisch verschil tussen de Chinese H5N1 stam uit 2004 en de gehanteerde wt-H5N1 stam. Beiden hebben hun oorsprong in de Zuid-Aziatische H5N1 uitbraak van 2003. De COGEM verwacht daarom dat het hanteren van de Chinese virusstam, in plaats van wt-H5N1, geen noemenswaardige andere uitkomsten te zien zal geven. De gekozen

tijdsperiode is bovendien dusdanig ruim dat de COGEM van mening is dat het wt-H5N1 effectief geïnactiveerd wordt.

Zoals hierboven reeds gesteld is, zijn er in de literatuur weinig patiënten met een viremie beschreven. Van deze patiënten zijn soms virustiters in serum bepaald. In twee gevallen, blijken - na RT-PCR - 1×10^3 copies cDNA/ml en 9×10^4 copies cDNA/ml aanwezig te zijn (18;19). Aangezien de reductiefactor van de gehanteerde inactivatiemethode vele malen groter is (10^6) is de COGEM van mening dat de inactivatiemethode het eventueel aanwezige wt-H5N1 in serum reduceert tot nul.

Laboratoriumhandelingen kunnen plaatsvinden op ML-II niveau

Gezien het laagpathogene karakter van het geproduceerde PC1 virus en de effectiviteit van de inactivatiemethode, is de COGEM van mening dat inperkingsniveau ML-II voldoende inperking biedt om eventuele risico's als gevolg van de handelingen aanvaardbaar klein te maken, mits aanvullende voorschriften met betrekking tot werkzaamheden met recombinante influenzavirussen die beschreven zijn in het COGEM advies CGM/050201-01, in acht worden genomen (11).

De COGEM wijst de aanvrager op de mogelijkheid om de hemagglutinatiessay en de hemagglutinatieremmingsassay uit te voeren met geïnactiveerd rec-H5N1 virus. De COGEM merkt op dat virus geïnactiveerd door middel van formaline goed bruikbaar is in beide testen. De effectiviteit van de inactivatie is eenvoudig te testen door twee opeenvolgende passages in eieren. Indien de tweede passage negatief is, is het virus compleet geïnactiveerd.

Conclusie

De COGEM is van mening dat rec-H5N1 laagpathogeen is aangezien het virus bestaat uit twee genoomsegmenten van een hoogpathogeen virus en zes genoomsegmenten uit de verzwakte influenzavirusstam PR8. De COGEM acht de inactivatiemethode waarmee patiëntenserum vrijgemaakt wordt van eventueel aanwezig wt-H5N1 effectief zodat de kans op eventuele vorming van recombinatie met rec-H5N1 verwaarloosbaar klein is.

Gezien dit alles, kunnen de werkzaamheden met influenzavirussen volgens de COGEM op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden waarbij enkele aanvullende maatregelen in acht dienen te worden genomen.

Referenties

1. Knipe, M. D. en Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
2. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego.
3. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 54: 196-209.
4. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., en Skalka, A. M. (2004). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, Washington, D.C.
5. Lewis, D. B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-154.
6. Taubenberger, J. K. (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9713-5.
7. World Health Organization. Internet: <http://www.who.int/en/> (13 juli 2006).
8. Avian Influenza. Internet: <http://www.avianinfluenza.org/index.php/site/spain-confirms-1st-bird-flu-case/> (13 juli 2006).
9. Riedel, S. (2006). Crossing the species barrier: the threat of an avian influenza pandemic. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 19: 16-20.
10. COGEM advies CGM/040326-03. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen.
11. COGEM advies CGM/050201-01. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinant Influenza A virussen.
12. Subbarao, K., Chen, H., *et al.* (2003). Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* 305: 192-200.
13. Taubenberger, J. K. (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9713-9715.
14. Wood, J. M. en Robertson, J. S. (2004). From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2: 842-847.
15. World Health Organization (WHO), Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment. (2003), no. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.5.
16. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., en Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842.
17. Jones, S.R. (1976). Potential complications of influenza A infections. *West J Med* 125: 341-346.
18. Chutinimitkul, S., Bhattarakosol, P., *et al.* (2006). H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis* 12(6): 1041-1043.
19. De Jong, M.D., Bach V.C. *et al.* (2005). Fatal avian influenza A in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 352(7): 686-691.