

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** 18 december 2006  
**KENMERK** CGM/061218-01  
**ONDERWERP** Advies handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van 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 H7 en N7, afkomstig van een hoog pathogene influenzastam, toegevoegd. Met dit recombinante H7N7 virus (rec-H7N7) wil de aanvrager bepalen of bij mensen na een doorgemaakte infectie met wild type H7N7 antistoffen in hun bloeds serum aanwezig is. De aanvrager wil de analyses uitvoeren op inperkingsniveau ML-II.

Rec-H7N7 is niet-virulent, omdat onder andere de basische klievingplaats van H7 afwezig is en een verzwakte vaccinstam de basis van het virus vormt.

Risico's met deze niet-virulente stam zouden kunnen ontstaan wanneer wildtype H7N7 virus aanwezig is in het patiëntenserum. Mogelijk zou na samenvoegen van het serum en rec-H7N7, 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 wild type influenza virus aanwezig is in patiëntenserum is namelijk verwaarloosbaar klein, mede doordat eventueel aanwezig wild type virus in het serum volledig geïnactiveerd wordt door een hitte-behandeling.

Gezien deze overwegingen kunnen de werkzaamheden met influenzavirussen volgens de COGEM veilig op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. Om eventuele risico's verder te beperken dienen aanvullende maatregelen in acht genomen te worden, waaronder het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet en het dragen van handschoenen.

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, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

# Handelingen met een recombinant H7N7 influenzavirus en serologisch onderzoek

## COGEM advies CGM/061218-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met een genetisch gemodificeerd influenza A virus. Dit virus bestaat uit twee genoomsegmenten afkomstig van een hoog pathogene aviaire stam H7N7 en zes genoomsegmenten van de niet-virulente verzwakte vaccinstam A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1). Met dit recombinante H7N7 (rec-H7N7) virus wil de aanvrager serologisch bepalen of mensen na blootstelling aan wildtype H7N7 (wt-H7N7) 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 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 alleen 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.

Als gevolg van een insertiemutatie van enkele aminozuren in de klievingsplaats, ontstaat een polybasische klievingsplaats. 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 weefsel in het gehele lichaam geïnfecteerd kunnen raken, met als gevolg een veranderde specificiteit, pathogeniteit en gastheerbereik van het virus (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 virussen van onder andere subtype H7.

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. De oorzaak 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 (7).

In het verleden zijn diverse hoogpathogene influenzavirussen ontstaan. In 2003 heeft er een uitbraak van het H7N7 virus plaatsgevonden in Nederland, België en Duitsland. Besmet pluimvee, ontlasting van besmette vogels en stofdeeltjes zijn de verspreidingsbronnen voor het aviaire influenzavirus (4;8). Het Nationale Influenza Centrum heeft 86 gevallen van humane H7N7 influenza infecties gerapporteerd onder pluimveewerkers en hun families. Het merendeel van deze mensen vertoonden conjunctivitis en griepachtige verschijnselen zoals koorts, hoest en spierpijn. Eén dierenarts is destijds aan de complicaties van de H7N7 infectie overleden (9;10). Doordat het H7N7 influenzavirus doorgaans geen mensen infecteert, ontbreken antistoffen hiertegen in de populatie (11). Tot voor kort werd gedacht dat H7N7 zich niet gemakkelijk van mens op mens zou kunnen verspreiden. Onderzoek naar de H7N7 uitbraak van 2003 in Nederland ontkracht deze veronderstelling. Bij mensen die het huishouden deelden met een geïnfecteerde pluimveewerker, maar niet zelf in aanraking waren geweest met pluimvee, werd in 59% van de serummonsters antilichamen tegen H7N7 aangetroffen (12).

### **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 adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen (13).

De COGEM heeft vorig jaar over een aanvraag geadviseerd (CGM/050201-01), waarbij onder andere recombinante virussen geproduceerd werden op basis van het geattenuerde influenzavirustype PR8 (H1N1) (14). 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 klievingsplaats bevat. Bovendien zijn er in de heterologe genoomsegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht.

De COGEM heeft geadviseerd om 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.

De onderhavige vergunningaanvraag betreft een wijziging op een vergunning waarover de COGEM eerder dit jaar reeds geadviseerd heeft (CGM/060724-04). Het betrof destijds werkzaamheden die vergelijkbaar zijn met de onderhavige werkzaamheden, maar waarbij gebruik gemaakt werd van een recombinant H5N1 influenzavirus in plaats van met rec-H7N7. Het recombinant H5N1 influenzavirus bestond uit een niet-virulent verzwakte vaccinstam A/Puerto Rico/8/34 waaraan het H5 en N1 segment, afkomstig van een

hoogpathogene influenzastam, zijn toegevoegd (15). Met behulp van dit recombinante virus werd getracht aan te tonen of mensen na blootstelling aan wildtype H5N1 antistoffen hadden gevormd. De COGEM heeft geadviseerd dat de werkzaamheden onder ML-II inperkingsniveau konden plaatsvinden met inachtneming van de aanvullende voorschriften, zoals gesteld in het COGEM advies CGM/050201-01.

Zeer recentelijk heeft de COGEM ook een algemeen advies (CGM/061214-01) uitgebracht over de te hanteren aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen op ML-III en ML-II niveau (16). Zij was van mening dat de aanvullende voorschriften geharmoniseerd konden worden zonder dat daarbij de veiligheid van mens en het milieu in het geding zou komen. De COGEM heeft onder andere geadviseerd dat bij werkzaamheden plaatsvindend onder ML-II niveau de volgende aanvullende voorschriften van toepassing zijn:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden
- Het dragen van handschoenen is verplicht
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf gevaccineerd te zijn

### **Adviesvraag**

Het doel van het onderzoek is het meten van antistoffen tegen wt-H7N7 in serum van eventueel besmette personen. De aanvrager wil deze werkzaamheden uitvoeren op ML-II niveau. Hij beschikt reeds over een vergunning om dezelfde experimenten uit te voeren met recombinant H5N1 in plaats van H7N7.

Rec-H7N7 is gebaseerd op de laag-virulente verzwakte stam PR8 waarin twee genoomsegmenten, H7 en N7, afkomstig van de hoog pathogene influenzastam geplaatst zijn. Overigens is de basische klievingsplaats verwijderd uit het H7 gen zodat de pathogeniteit verminderd is. De vervaardiging van rec-H7N7 maakt geen onderdeel uit van de vergunningaanvraag.

Alvorens rec-H7N7 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 en een hemagglutinatiessay en hemagglutineremmingsassay, deze assays worden hieronder kort beschreven.

### *Virus-neutralisatieassay*

Het doel van deze assay is het aantonen van de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen wt-H7N7 in patiëntenserum. Serum afkomstig van met wt-H7N7 geïnfecteerde patiënten wordt gedurende twee uur bij 37°C gemengd met rec-H7N7. 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 antistoffen in het patiëntenserum een infectie van de cellen met rec-H7N7 kan 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-H7N7 te bepalen. Ook voor deze assay wordt serum afkomstig van met wt-H7N7 geïnfecteerde patiënten gemengd met rec-H7N7. 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-H7N7 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-H7N7 aanwezig is, slaan de rode bloedcellen neer.

De aanvrager wil voorafgaand aan beide assays de patiëntensera verhitten om eventueel aanwezig wt-H7N7 te inactiveren. Om te bepalen onder welke omstandigheden de inactivatie het meest effectief is, heeft de aanvrager een kleine studie uitgevoerd. Hierbij is kippenserum besmet met wt-H7N7 (titer is  $1 \times 10^7$  virusdeeltjes/ml) waarna verhitting bij 56°C gedurende verschillende tijdsperiodes plaatsvindt.

De aanvrager wil de 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-H7N7 hoogpathogeen is en wanneer wt-H7N7 of eventueel andere wildtype influenzavirussen aanwezig is in het patiëntenserum. In deze laatste situatie zou namelijk recombinatie tussen wt-virus en rec-H7N7 kunnen optreden als cellen waarin de virussen zich kunnen repliceren aanwezig zijn. Dit is het geval bij de virus-neutralisatieassay, waarin onder andere MDCK-cellen gebruikt worden. In de hemagglutinatieassay en hemagglutinatieremmingsassay 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-H7N7 beoordeeld. Ten tweede wordt bepaald of de door de aanvrager gehanteerde methode ter inactivatie van wt-H7N7 in serum effectief is. In de risicoanalyse wordt verder rekening gehouden met de kans dat wt-H7N7 daadwerkelijk aanwezig is in serum van met influenza besmette personen. Daarnaast wordt de kans op recombinatie van wt-H7N7 en rec-H7N7 meegenomen in de overweging.

#### *Rec-H7N7 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 (17;18;19;20). 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 influenzavirussen, niet virulent zijn voor mensen (19). Daarnaast draagt het verwijderen van de basische klievingplaats in het HA eiwit van het rec-H7N7 influenzavirus tevens bij aan een drastische vermindering van de pathogeniteit voor mensen (20).

Uit (nog) ongepubliceerde data van experimenten met een vergelijkbare verzwakte virusstam, A/WSN/33, waarin H7 en N7 zijn toegevoegd, bleek na intraveneuze inoculatie in kippen dat dit recombinante virus niet virulent was. Bovendien veroorzaakte dit virus géén ziekteverschijnselen ondanks de aanwezigheid van de basische klievingsite in het H7 segment (21).

De Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) heeft aangegeven dat recombinante virussen, bestaande uit zes genoomsegmenten van PR8, en maximaal twee segmenten van een hoogpathogeen 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 (18;19).

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.



### *Methode voor inactivatie van wildtype H7N7 in serum is effectief*

Over het algemeen veroorzaken influenzavirussen aandoeningen aan de luchtwegen en wordt het virus slechts zelden geïsoleerd uit andere weefsels (22). De aanwezigheid van influenzavirussen in het bloed, viremie, wordt daarom zeldzaam geacht (22;23). Tot nu toe zijn er in de literatuur sporadisch gevallen van patiënten met een viremie beschreven (17;18). Overigens trad de viremie in bijna alle gevallen op tijdens de incubatieperiode of tijdens de eerste 48 uur van ziekte (22).

Indien in een uitzonderlijke situatie wt-H7N7 aanwezig is in patiëntenserum zou eventueel recombinatie met rec-H7N7 kunnen optreden bij gelijktijdige incubatie op influenzavirus gevoelige cellen. Om dit te voorkomen, wordt wt-H7N7 in serum geïnactiveerd door een hitte-behandeling.

Uit de door de aanvrager aangeleverde data, blijkt dat de inactivatie van wt-H7N7 effectief is bij verhitting (56°C) gedurende minimaal 60 minuten. Deze incubatie brengt een reductiefactor van  $1 \times 10^7$  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 validatie-experimenten zijn uitgevoerd met een wt-H7N7 influenzastam en kippenserum. De COGEM is van mening dat de resultaten voortkomend uit deze inactivatiemethode vergelijkbaar zullen zijn voor humaan serum en rec-H7N7.

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM de kans dat wt-H7N7 na hitte-inactivatie gedurende minimaal 60 minuten bij 56°C nog aanwezig is, verwaarloosbaar klein. Hieruit volgt dat zij de kans op recombinatie tussen rec-H7N7 en wt-H7N7 ook verwaarloosbaar klein acht.

### *Laboratoriumhandelingen kunnen plaatsvinden op ML-II niveau*

Gezien het laagpathogene karakter van het geproduceerde rec-H7N7 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. Hierbij adviseert zij het in acht nemen van de aanvullende voorschriften die gesteld zijn in het COGEM advies CGM/061214-01 (16).

### **Conclusie**

De COGEM is van mening dat rec-H7N7 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-H7N7 effectief, zodat de kans op eventuele vorming van recombinatie met rec-H7N7 verwaarloosbaar klein is.

Gezien dit alles, kunnen de werkzaamheden met influenzavirussen volgens de COGEM op ML-II inperkingniveau uitgevoerd worden. Om eventuele risico's verder te beperken dienen aanvullende maatregelen in acht genomen te worden.

## 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. Lewis, D.B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-154.
8. World Health Organization. Internet: <http://www.who.int/en/> (13 december 2006).
9. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., van der Nat H., Vennema H., Meijer A., van Steenbergen J., Fouchier R., Osterhaus A., Bosman A. (2004) Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *The Lancet* 363: 587-593
10. Fouchier R. A., Schneeberger P.M., Roendaal F.W., Broekman J.M., Kemink S.A., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Van Doornum G.J., Koch G., Bosman A., Koopmans M., Osterhaus A.D. (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101: 1356-1361
11. CDC (2003) Human cases of avian influenza A (H7N7) infection- The Netherlands, 2003. Internet <http://www.cdc.gov/flu/avian/h7n7-netherlands.htm>
12. Bosman A., Meijer A., Koopmans M. (2005) Final analysis of Netherlands avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363: 587-593
13. COGEM (2004). *Inschaling van Influenza A virusstammen (CGM/040326-03)*
14. COGEM (2005). *Pathogeniteitstudies met recombinant Influenza A virussen (CGM/050201-01)*.
15. COGEM (2006). *Handelingen met een laag pathogene H5N1 influenza stam en serologisch onderzoek (CGM/060724-04)*.

16. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenzavirussen (CGM/061214-01).
17. 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.
18. 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.
19. World Health Organization (WHO, 2005), WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines
20. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., en Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H7N7 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842.
21. Persoonlijke communicatie met dr. B.P.H. Peeters, Central Institute for Animal Disease Control (CID-Lelystad).
22. Jones, S.R. (1976). Potential complications of influenza A infections. *West J Med* 125: 341-346.
23. Chutinimitkul, S., Bhattarakosol, P., *et al.* (2006). H7N7 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis* 12(6): 1041-1043.