

Advies betreffende: **MVA-HIV A vaccin klinische fase I studie**

Kennisgever: **Gemeentelijke Geneeskundige en Gezondheidsdienst (GG&GD)  
Amsterdam**

COGEM kenmerk  
**CGM/031211-02**

BGGO nummer  
**BGGO 03/05**

Datum advies  
**13 december 2003**

## Inleiding

De ziekte AIDS wordt veroorzaakt door het *Human immunodeficiency virus* (HIV). Het virus behoort tot de *retroviridae* en infecteert witte bloedcellen (CD4) van het afweersysteem. Hierdoor wordt het immuunsysteem verzwakt waardoor de kans op bepaalde infecties of tumoren toeneemt. Meer dan 40 miljoen mensen zijn wereldwijd geïnficeerd met het virus, dat door bloed-bloed contact of onbeschermd seksueel contact overgebracht kan worden. Het virus komt wereldwijd voor. Met name in ontwikkelingslanden komt het virus op zeer grote schaal voor en verloopt de bestrijding en behandeling van HIV infecties erg moeizaam. De meest gangbare medicatie is op dit moment de zogenaamde combinatietherapie. De combinatietherapie geeft verschillende middelen tegen HIV tegelijkertijd, maar heeft als nadeel dat alleen de aanmaak van het virus geremd wordt. Daarbij treedt bij de huidige therapieën resistentie op waardoor het virus ongevoelig wordt voor antivirale middelen. Om de HIV epidemie te kunnen beheersen wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een vaccin.

De onderhavige studie maakt deel uit van het onderzoek naar een vaccin gericht tegen een HIV stam (HIV-1 Clade A) die in Kenia het meest voorkomt. Het onderzoek heeft betrekking op werkzaamheden in het kader van fase I klinische studies waarbij gebruik gemaakt wordt van een viraal vaccin dat gebaseerd is op een pokkenvirusstam, 'Modified Vaccinia Ankara' (MVA), waarin een HIV A sequentie is ingebracht. De sequentie codeert voor een aantal HIV eiwitten die mogelijk betrokken zijn bij immuunreacties. Het doel van het vaccin is om immuniteit op te wekken tegen HIV Clade A (25). De aanvraag betreft de vaccinatie van proefpersonen met het genetisch gemodificeerde vaccin, MVA-HIV A, en het uitvoeren van laboratoriumtests van monsters afkomstig van de proefpersonen. Doelstelling van het onderzoek is om de veiligheid te bestuderen van drie verschillende toedieningsvormen (intramusculair, subcutaan en intradermaal) in drie verschillende doses van het genetisch gemodificeerde vaccin MVA HIV A.

## Aspecten van de vector

De MVA vector die in deze studie gebruikt wordt is ontwikkeld en beschreven in de jaren zeventig (16). De vector is afgeleid van het vacciniavirus, stam Ankara, en is een van de meest geattenueerde vacciniastammen (25). De attenuatie is ontstaan ten gevolge van meer dan 570 passages van het vacciniavirus in kippenembryofibroblasten. Hierdoor is het gastheerbereik van MVA beperkter geworden en is het niet meer in staat om in mensen of andere zoogdieren te vermenigvuldigen (4). De verminderde gastheerbereik is onder andere ontstaan als gevolg van een aantal goed gekarakteriseerde deleties van in totaal 31 kilobasen in het virale genoom van MVA (2; 17; 21; 21). In kippenembryofibroblasten kan MVA nog repliceren, maar in humane cellen is geen replicatie mogelijk. Voor zover bekend kan ook in andere zoogdiercellen, met uitzondering van BHK (Baby Hamster Kidney) cellen, geen replicatie plaatsvinden (6). Een defect in de late fase van de virusassemblage zorgt ervoor dat viruspartikels niet gevormd kunnen worden. Zoogdiercellen kunnen echter wel geïnfecteerd worden met MVA, waardoor virale en recombinante eiwitten tot expressie gebracht worden (2).

De vacciniastam MVA is veelvuldig gebruikt voor vaccinatiestudies (23). Ongeveer 120.000 mensen zijn reeds gevaccineerd tegen pokken met een MVA construct zonder dat daarbij incidenten optraden (16; 18; 23). Uit andere studies is gebleken dat in immuundeficiënte dieren MVA niet-pathogeen is (22). Het 'Center for Disease Control' (CDC) in de Verenigde Staten alsmede het 'National Institutes of Health' (NIH) heeft MVA ingeschaald op biosafety level 1 (27-29). Dit is het laagste veiligheidsniveau. De COGEM heeft recentelijk geadviseerd (CGM/030519-06) om MVA in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1), aangezien voldoende is aangetoond dat MVA avirulent en onschadelijk is bij toepassing in mens en dier.

## Aspecten van de insertie

HIV is een RNA virus en behoort tot de *Retroviridae* (25). Voor het insert in de MVA vector wordt een deel van het HIV genoom gebruikt. De gebruikte sequentie wordt door de aanvrager aangeduid als HIV A. De HIVA DNA sequentie is 1602 basenparen groot en codeert voor een eiwit dat is opgebouwd uit verschillende delen van door HIV gecodeerde eiwitten aangevuld met coderende sequenties van *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en *Simian virus 5* (SV5). Het grootste gedeelte van HIVA (73%) bestaat uit sequenties coderend voor het HIV *gag* eiwit. Dit structurele eiwit is betrokken bij diverse stadia gedurende virusassemblage (15; 25). Het overige deel bevat de sequenties van 25 overlappende epitopen van elk 8-10 aminozuren afkomstig van de door HIV gecodeerde structurele eiwitten *gag*, *pol*, *nef* en *env* (11). Het *pol* eiwit is betrokken bij de transcriptie van het virale genoom en de integratie in het gastheergenoom (15; 25). Het *nef* eiwit speelt ondermeer een rol bij de virusinfectie en de inhibitie van de expressie van

bepaalde oppervlakteiwitten van het immuunsysteem in de gastheercel (15; 25). Het *env* eiwit is een oppervlakteiwit van het virus en is betrokken bij het gastheertropisme (15; 25). Het *gag* domein van het HIVA bevat de *gag* eiwitten p24 en p17 in een omgekeerde oriëntatie ten opzichte van het virale *gag* eiwit. Deze reorganisatie komt ten goede aan de immunogeniteit van het vaccin. Het p24 eiwit is onderdeel van het capsid en het p17 eiwit is onderdeel van de matrix van het HIV virion (15; 25). Het HIVA eiwit bevat eveneens SIV *gag* en HIV *env* epitopen die door het immuunsysteem van onder andere rhesusapen en muizen herkend worden. Hierdoor is het mogelijk om in deze dieren de kwaliteit, reproduceerbaarheid en stabiliteit van het vaccin te bestuderen (11; 26). Om te testen of de HIVA sequentie na vaccinatie van de proefpersoon in zijn geheel tot expressie komt is aan de C-terminus van HIVA het monoclonaal antilichaam epitoom Pk gekoppeld (9). Het is mogelijk dat het lichaam hierdoor antilichamen tegen Pk produceert, maar het Pk epitoom is eerder gebruikt in een ander HIV A construct zonder dat hierbij schadelijke effecten bij de gevaccineerde proefpersonen zijn waargenomen (9; 12).

### **Interactie ggo en de patiënt en zijn omgeving**

De productie van het MVA-HIV A vaccin wordt uitgevoerd in Duitsland. Het MVA-HIV A vaccin wordt opgekweekt in kippenembryofibroblasten welke afkomstig zijn van specifiek pathogeen vrije (SPF) kippeneieren. Bij de uitvoering van de vaccinatie met MVA-HIV A wordt het genetisch gemodificeerde vaccin toegediend door een injectie in de schouder. In de studie worden drie verschillende wijzen van toediening gehanteerd, te weten intramusculair, intradermaal en subcutaan. De aanvrager geeft aan dat de hoogste dosis van het vaccin niet hoger zal zijn dan  $5 \times 10^8$  pfu MVA-HIV A. Aan de onderhavige studie zullen in verschillende landen in totaal 111 proefpersonen deelnemen, waarvan 21 een placebo en de overige het vaccin toegediend zullen krijgen.

Na infectie van een cel met het MVA-HIV A vaccin zal gedurende enkele dagen of weken synthese plaatsvinden van het HIVA genproduct. De MVA vector kan niet in het menselijk genoom integreren. Tevens kan de MVA vector niet repliceren waardoor geen nieuwe virusdeeltjes gevormd worden (6). Het DNA zal onbeschermd in de cel aanwezig blijven waarna het binnen enkele dagen tot weken afgebroken wordt door DNA afbrekende enzymen (nucleases) (1). In experimenten met muizen en rhesusapen is vastgesteld dat het MVA-HIV A vaccin in staat is een specifieke immunrespons te induceren tegen HIVA eiwitten (10; 11; 13; 20; 26). Met behulp van dierexperimenten met muizen is aangetoond dat vaccinatie geen waarneembare toxische of andere negatieve effecten veroorzaakt (9-11).

Het vaccin kan in het milieu terechtkomen doordat het vaccin uit de ampul of naald gemorst wordt of doordat het vaccin uit de injectieplaats vrijkomt. Om lekkage uit de

injectieplaats tegen te gaan wordt door de aanvrager aangegeven dat de injectieplaats gedurende een aantal dagen met een waterbestendige pleister afgedicht wordt. Een andere mogelijke verspreidingsbron van het vaccin zijn handelingen met monsters van de proefpersonen tijdens laboratoriumonderzoek. De aanvrager heeft aangegeven om voorzorgsmaatregelen te treffen, zoals het dragen van beschermende kleding en handschoenen, om de kans op verspreiding van het vaccin te minimaliseren.

## **Beschouwing en risicoanalyse**

In Groot-Brittannië en Kenia zijn in het verleden al eerder een aantal fase I klinische studies uitgevoerd met het MVA-HIV A vaccin (12). Uit de resultaten van deze studies kan geconcludeerd worden dat het MVA-HIV A vaccin goed wordt verdragen door de proefpersonen. De gebruikte MVA vector is een van de meest geattenuëerde vaccinia-stammen (25). Naast het gebruik in laboratoria is MVA veelvuldig gebruikt voor vaccinatiestudies (23). Tot op heden zijn ongeveer 120.000 mensen tegen pokken gevaccineerd met een MVA construct zonder dat daarbij incidenten optraden (16; 18; 23). Zowel het 'CDC' als het 'NIH' in de Verenigde Staten hebben MVA ingeschaald op laagste veiligheidsniveau (27-29). Tevens heeft de COGEM geadviseerd (CGM/030519-06) om MVA in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse. De COGEM is van mening dat voldoende aangetoond is dat MVA avirulent en onschadelijk is bij toepassing in mens en dier en dat de risico's bij toepassing voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Als insertie voor de MVA vector wordt een HIV sequentie van 1.602 basenparen gebruikt die als zodanig niet voorkomt in het HIV genoom. Het wildtype HIV genoom is ongeveer 10 kilobasenparen groot. De HIV A DNA sequentie codeert voor een eiwit dat is opgebouwd uit onder meer verschillende delen van door HIV gecodeerde structurele eiwitten. Met uitzondering van het *gag* eiwitdeel bestaan de overige eiwitdelen uit epitopen van 8 tot 10 aminozuren van *gag*, *pol*, *nef* en *env* die herkend kunnen worden door het immuunsysteem (11). Gezien de relatief kleine HIV sequentie in de MVA vector is de kans op recombinatie met wildtype HIV in proefpersonen die HIV-positief zijn uiterst gering. De kans op recombinatie neemt immers toe bij een grotere sequentieovereenkomst. In de studie worden enkel vrijwilligers opgenomen welke HIV negatief zijn waardoor de kans op recombinatie met wildtype HIV nog veel kleiner is. Daarbij zal de MVA vector met het HIV insert slechts enkele dagen tot weken in het lichaam aanwezig blijven omdat MVA niet in het menselijk genoom kan integreren (6). Indien in het onwaarschijnlijke geval recombinatie optreedt tussen de MVA HIV A vector en wildtype HIV zal nooit een HIV virus gevormd worden met een grotere virulentie of gastheerbereik dan het wildtype HIV. De COGEM is derhalve van mening dat met de te gebruiken MVA- HIV A vector in de onderhavige studie de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Door de koppeling van een monoclonaal antilichaam epitoom Pk aan de C-terminus van HIV A is het mogelijk dat het lichaam anti Pk antilichamen produceert (9). Het Pk epitoom is echter eerder gebruikt in een andere vaccinatiestudie in mensen met het HIVA construct zonder dat hierbij schadelijke effecten zijn waargenomen (9; 12). Daarnaast bevat het construct ook nog een beta-galactosidasegen. Dit gen wordt vaak gebruikt om expressie van het construct te detecteren en wordt al vele jaren toegepast *in vitro* en *in vivo* studies zonder nadelige effecten (7; 12; 14; 26). De COGEM is van mening dat beide additionele sequenties een verwaarloosbaar klein risico vormen.

Het vaccin kan in het milieu terechtkomen door lekkage uit de injectieplaats. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager getroffen voorzorgsmaatregelen, zoals het dragen van beschermende kleding en handschoenen, de kans op verspreiding van het vaccin geminimaliseerd wordt. De COGEM wijst op het belang van het zorgvuldig afplakken van de injectieplaats ter voorkoming van besmetting. Gedurende de behandeling worden voorzorgsmaatregelen getroffen om beddengoed te ontsmetten dat verontreinigd is als gevolg van lekkage van het virus uit de injectieplaats. De COGEM is van mening dat dit voorschrift uitgebreid moet worden met het ontsmetten van kleding aangezien kleding naast beddengoed ook besmet kan worden indien de injectieplaats niet goed is afgeplakt.

De gebruikte HIV A sequentie codeert voor T cel epitopen. Hierdoor zullen hoofdzakelijk cytotoxische T-lymfocyten betrokken zijn bij de immuunrespons. Het ontstaan van een antilichaamrespons zal door het gebruik van T cel epitopen zeer onwaarschijnlijk zijn. Indien toch antilichamen opgewekt worden, dan zouden die antilichamen het binnendringen van HIV in gastheercellen mogelijk kunnen bevorderen, zoals gebleken is in *in vitro* experimenten (5; 8; 24). Dit type antilichamen worden ook 'enhancing antibodies' genoemd (8). Hierdoor zouden de proefpersonen bij een latere infectie met HIV vatbaarder kunnen zijn voor het virus (8). Een dergelijke 'enhancement' is overigens *in vivo* nooit waargenomen.

Alleen oppervlakteiwitten van HIV, zoals gp120, die herkend dienen te worden door B cellen kunnen het ontstaan van zogenaamde 'enhancing antibodies' bewerkstelligen (5; 24). De gebruikte HIV A sequentie bevat slechts één enkel T cel epitoom van 8 tot 10 aminozuren dat codeert voor het oppervlakteiwit *env*. Dit in tegenstelling tot het wildtype HIV waarbij legio B cel epitopen van HIV oppervlakteiwitten mogelijk zijn (19). Hierdoor is de COGEM van mening dat de risico's op het ontstaan van 'enhancing antibodies' met de gebruikte HIV A sequentie verwaarloosbaar klein zijn.

Voorts signaleert de COGEM dat het niet uitgesloten kan worden dat vaccinatie met MVA HIV A een antilichaamrespons veroorzaakt die tot gevolg heeft dat een proefpersoon positief reageert in een zogenaamde HIV test, aangezien de huidige HIV tests gebaseerd zijn op de aanwezigheid van antilichamen tegen HIV. De aanvrager

geeft echter aan dat in voorgaande studies waarbij met HIV A eiwitten is gevaccineerd geen seroconversie is waargenomen (3; 11; 12). Seroconversie is de verandering van het resultaat van een specifieke serologische test van negatief naar positief, waarmee de aanwezigheid van antilichamen aangetoond kan worden.

## Conclusie en Advies

De COGEM is van mening dat het in de ontwerpbeschikking gestelde voorschrift voor het ontsmetten van beddengoed dat verontreinigd is als gevolg van lekkage van het virus uit de injectieplaats, uitgebreid dient te worden met het ontsmetten van kleding aangezien kleding naast beddengoed ook besmet kan worden indien de injectieplaats niet goed is afgeplakt. Met inachtneming van deze voorwaarde is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van de beschreven klinische fase I studie, waarbij vrijwillige proefpersonen met een genetisch gemodificeerde vaccin, MVA-HIV A, gevaccineerd zullen worden, verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York.
2. Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**, blz. 365-96
3. Buge, S. L., Ma, H. L., Amara, R. R., Wyatt, L. S., Earl, P. L., Villinger, F., Montefiori, D. C., Staprans, S. I., Xu, Y., Carter, E., O'Neil, S. P., Herndon, J. G., Hill, E., Moss, B., Robinson, H. L., and McNicholl, J. M. (2003). Gp120-alum boosting of a Gag-Pol-Env DNA/MVA AIDS vaccine: poorer control of a pathogenic viral challenge. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, blz. 891-900
4. Carroll, M. W. and Moss, B. (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* **238**, blz. 198-211
5. Davis, D., Trischmann, H., Stephens, D. M., and Lachmann, P. J. (2001). Antibodies raised to short synthetic peptides with sequences derived from HIV-1 SF2 gp120 can both neutralize and enhance HIV-1 SF13: a later variant isolated from the same host. *J Med Virol* **64**, blz. 207-16
6. Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., and Sutter, G. (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* **79 ( Pt 2)**, blz. 347-52

7. Fomsgaard, A., Nielsen, H. V., Nielsen, C., Johansson, K., Machuca, R., Bruun, L., Hansen, J., and Buus, S. (1998). Comparisons of DNA-mediated immunization procedures directed against surface glycoproteins of human immunodeficiency virus type-1 and hepatitis B virus. *APMIS* **106**, blz. 636-46
8. Fust, G. (1997). Enhancing antibodies in HIV infection. *Parasitology* **115 Suppl**, blz. S127-40
9. Hanke, T., Barnfield, C., Wee, E. G., Agren, L., Samuel, R. V., Larke, N., and Liljestrom, P. (2003). Construction and immunogenicity in a prime-boost regimen of a Semliki Forest virus-vectored experimental HIV clade A vaccine. *J Gen Virol* **84**, blz. 361-8
10. Hanke, T., Blanchard, T. J., Schneider, J., Ogg, G. S., Tan, R., Becker, M., Gilbert, S. C., Hill, A. V., Smith, G. L., and McMichael, A. (1998). Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. *J Gen Virol* **79 ( Pt 1)**, blz. 83-90
11. Hanke, T. and McMichael, A. J. (2000). Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med* **6**, blz. 951-5
12. Hanke, T., McMichael, A. J., Mwau, M., Wee, E. G., Ceberej, I., Patel, S., Sutton, J., Tomlinson, M., and Samuel, R. V. (2002). Development of a DNA-MVA/HIVA vaccine for Kenya. *Vaccine* **20**, blz. 1995-8
13. Hanke, T., Samuel, R. V., Blanchard, T. J., Neumann, V. C., Allen, T. M., Boyson, J. E., Sharpe, S. A., Cook, N., Smith, G. L., Watkins, D. I., Cranage, M. P., and McMichael, A. J. (1999). Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* **73**, blz. 7524-32
14. Kent, S. J., Cameron, P. U., Reece, J. C., Thompson, P. R., and Purcell, D. F. (2001). Attenuated and wild-type HIV-1 infections and long terminal repeat-mediated gene expression from plasmids delivered by gene gun to human skin ex vivo and macaques in vivo. *Virology* **287**, blz. 71-8
15. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
16. Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K., and Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* **167**, blz. 375-90
17. Moss, B. (1994). Replicating and host-restricted non-replicating vaccinia virus vectors for vaccine development. *Dev Biol Stand* **82**, blz. 55-63
18. Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, blz. 11341-8
19. Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1996). *Immunology*. Mosby. London.
20. Seth, A., Ourmanov, I., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Carroll, M. W., Wyatt, L. S.,

Moss, B., Forman, M. A., Hirsch, V. M., and Letvin, N. L. (1998). Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, blz. 10112-6

21. Spehner, D., Drillien, R., Proamer, F., Houssais-Pecher, C., Zanta, M. A., Geist, M., Dott, K., and Balloul, J. M. (2000). Enveloped virus is the major virus form produced during productive infection with the modified vaccinia virus Ankara strain. *Virology* **273**, blz. 9-15

22. Stittelaar, K. J., Kuiken, T., de Swart, R. L., van Amerongen, G., Vos, H. W., Niesters, H. G., van Schalkwijk, P., van der Kwast, T., Wyatt, L. S., Moss, B., and Osterhaus, A. D. (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* **19**, blz. 3700-9

23. Sutter, G. and Moss, B. (1995). Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* **84**, blz. 195-200

24. Takeda, A., Robinson, J. E., Ho, D. D., Debouck, C., Haigwood, N. L., and Ennis, F. A. (1992). Distinction of human immunodeficiency virus type 1 neutralization and infection enhancement by human monoclonal antibodies to glycoprotein 120. *J Clin Invest* **89**, blz. 1952-7

25. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.

26. Wee, E. G., Patel, S., McMichael, A. J., and Hanke, T. (2002). A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques. *J Gen Virol* **83**, blz. 75-80

27. National Institutes of Health. Appendix D-56 [NIH Guidelines]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1993. Internet: [http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines\\_02/Appendix\\_D.htm](http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/Appendix_D.htm) (16 mei 2003)

28. National Institutes of Health. Modifications to NIH vaccinia immunization policy [Memorandum dated 8 Aug 1996]. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1996.

29. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), June 22, 2001. MMWR 2001;50. No. RR-10. Internet: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/RR5010.pdf> (16 mei 2003)