

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 24 november 2009
KENMERK CGM/091124-04
ONDERWERP Advies: verzoek omlaagschaling werkzaamheden *Humaan metapneumovirus*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging van vergunning IG 01-154 met de titel '*Onderzoek aan humaan metapneumovirus (hMPV)*' van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van werkzaamheden met het *Humaan metapneumovirus* (hMPV). hMPV behoort tot de familie van de paramyxovirussen en is een pathogeen van klasse 2 dat bij infectie respiratoire symptomen (verkoudheidsverschijnselen) bij mens en/of dier veroorzaakt.

De COGEM adviseerde eerder om handelingen met chimere virussen bestaande uit hMPV en andere pneumovirussen één inperkingsniveau hoger in te schalen (ML-III) dan op basis van de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen (klasse 2) verwacht mocht worden. De reden hiervoor was dat het destijds een relatief onbekend virus betrof waardoor de mogelijke risico's van handelingen met het virus moeilijk in te schatten waren.

Sinds het vorige advies is er meer informatie over deze virussen en de functie van de virale genen beschikbaar gekomen. Er zijn geen aanwijzingen dat de voorgenomen uitwisseling van genen, waardoor chimere metapneumovirussen zullen ontstaan, tot een virus zullen leiden waarvan de pathogeniteit hoger ligt dan het uitgangsorganisme van pathogeniteitsklasse 2. De meerderheid van de COGEM leden kan daarom instemmen met een inschaling van de voorgenomen werkzaamheden in het laboratorium op ML-II niveau en voor dierexperimenten op DM-II niveau zoals voorgesteld in de conceptbeschikking.

Drie COGEM leden kunnen niet instemmen met dit advies en hebben gevraagd een minderheidsstandpunt in dit advies op te nemen. Zij wijzen erop dat het hier virussen betreft die via ondermeer aerosolen direct op de mens overgedragen kunnen worden, dat chimere metapneumovirussen mogelijk niet geattenuëerd zijn en dat een nieuw chimeer virus zich in de menselijke populatie kan verspreiden. Daarom zijn zij van mening dat de werkzaamheden op ML-III niveau uitgevoerd moeten worden en dat alleen werkzaamheden met chimere virussen met voldoende aannemelijk gemaakte attenuerende modificaties omlaag geschaald kunnen worden naar ML-II niveau.

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 stylized loop followed by a horizontal stroke and a small vertical tick.

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

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

Onderzoek aan humaan metapneumovirus (hMPV)

COGEM advies CGM/091124-04

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van werkzaamheden met *Humaan metapneumovirus* (hMPV). De aanvraag betreft een verzoek tot wijziging op een bestaande vergunning, IG 01-154. Binnen deze vergunning vindt productie van zowel chimere als niet-chimere pneumovirussen plaats die *in vitro* en in een aantal diermodellen (*in vivo*) worden getest. Het onderzoek heeft als doel een levend geattenuëerd hMPV vaccin te ontwikkelen en de interactie tussen (pneumo)virus en gastheer te bestuderen.

De werkzaamheden betreffen onder meer de karakterisatie van individuele hMPV producten en kloneringswerkzaamheden in *Escherichia coli* van hMPV en *Respiratory syncytial virus* (RSV), *Avian pneumovirus* (APV) en *Parainfluenzavirus* (PIV), en het creëren van chimere virussen waarbij structurele genen van deze virussen worden uitgewisseld. Daarnaast vindt *in vitro* productie van wildtype en chimere virussen plaats, evenals het testen van de geproduceerde virussen in diermodellen.

1.1 Humaan metapneumovirus (hMPV)

hMPV is een niet-gesegmenteerd negatief-strengs RNA virus met membraan. Het hMPV behoort tot de *Pneumoviridae* die worden onderverdeeld in de genera *Pneumovirus* en *Metapneumovirus*. Verwante virussen zijn RSV, PIV en APV. Al deze virussen behoren tot de familie van de paramyxovirussen. Zowel hMPV, RSV, APV als PIV zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (5). De klinische symptomen van infectie met hMPV zijn vergelijkbaar met de symptomen die veroorzaakt worden door RSV (1,6,8). Deze variëren van milde klachten van de bovenste luchtwegen tot ernstige bronchiolitis en pneumonie, vaak gepaard gaand met ernstig hoesten, spierpijn en braken. Studies hebben aangetoond dat vrijwel alle kinderen in Nederland een hMPV infectie hebben doorgemaakt als zij de leeftijd van 5 jaar bereiken (8). Herinfecties komen regelmatig voor en kunnen gepaard gaan met ziekteverschijnselen. Het virus infecteert met name kinderen op jonge leeftijd (0-2 jaar), immuungecompromitteerde individuen en bejaarden. Daarnaast is bekend dat het hMPV al minstens 50 jaar in de menselijke populatie circuleert (8).

2. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2001 een advies uitgebracht over deze vergunning (5). Zij adviseerde destijds handelingen met chimere virussen bestaande uit hMPV en andere pneumovirussen één inperkingsniveau hoger in te schalen (ML-III) dan op basis van de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen (pathogeniteitsklasse 2) verwacht mocht worden. De reden hiervoor was dat er destijds nog weinig onderzoek was gedaan naar dit virus waardoor de mogelijke risico's van handelingen met het virus moeilijk in te schatten waren. Gezien de transmissieroute (via lucht / aerosolen) en het onbekende virulentie fenotype van de chimere virussen werden er daarnaast

aanvullende voorschriften geadviseerd om verspreiding te voorkomen. De COGEM heeft destijds aangegeven dat omlaagschaling van handelingen met chimere paramyxovirussen alleen mogelijk is als er op basis van *in vivo* experimenten vastgesteld kan worden dat het gevormde chimere virus op een lager inperkingsniveau gehanteerd kan worden.

In 2003 heeft de COGEM op basis van nieuwe gegevens geadviseerd om hMPV conform andere pneumovirussen te classificeren als een virus van pathogeniteitsklasse 2. Tevens heeft de COGEM geadviseerd om een aantal werkzaamheden met een chimere bovine/humane PIV3 variant met insertie van goed gekarakteriseerde immuunstimulerende G of F genen van hMPV of RSV van ML-III naar ML-II inperkingsniveau omlaag te schalen. De COGEM concludeerde dat de aanvrager voldoende aannemelijk had gemaakt dat de gevormde chimeren geen verhoogde virulentie zouden vertonen (6).

3. Adviesvraag / voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt een aantal andere werkzaamheden met chimere paramyxovirussen omlaag te schalen van ML-III naar ML-II en van DM-III naar DM-II niveau. Het betreft zowel *in vitro* werkzaamheden met chimere paramyxovirussen als *in vivo* experimenten in associatie met kleine proefdieren (muizen, ratten, cavia's en hamsters). De aanvrager levert ter onderbouwing voor deze omlaagschaling een specificatie van de chimere paramyxovirussen die hij wil produceren. Op basis van de uit te wisselen genen kunnen de chimere paramyxovirussen die de aanvrager wil produceren worden ingedeeld in vier categorieën:

1. Individuele genen van hMPV (m.u.v. het polymerase eiwit) geplaatst op de positie van genen voor niet-structurele eiwitten NS1 /NS2 in een geattenuerde RSV-backbone waarin deze NS1/NS2 genen zijn verwijderd om de interactie van de recombinanten met het innate immuunsysteem te testen. Doel is de identificatie van hMPV eiwitten die het innate immuunsysteem kunnen ontduiken (interferon antagonist).
2. Uitwisseling van individuele genen en combinaties van APV genen in het wildtype hMPV backbone. Het betreft in eerste instantie uitwisseling van individuele genen die betrokken zijn bij de replicatie (M, F, G, SH, M2.1 en M2.2) maar het kan niet worden uitgesloten dat in een later stadium ook combinaties van genen zullen worden uitgewisseld. Deze specifieke combinaties zijn nog onbekend. Ook hier is het doel de identificatie van hMPV eiwitten die het immuunsysteem kunnen ontduiken.
3. Uitwisseling van de interferon antagonist van hMPV en APV in de APV backbone. Het beoogde hMPV dat hierbij zal worden uitgewisseld is nog onbekend. Identificatie van dit gen vindt plaats onder 1 en 2.
4. Uitwisseling van het fosfoproteïne (V/C) eiwit van PIV5/SV5 met het fosfoproteïne van hMPV in de SV5 backbone indien het fosfoproteïne van hMPV blijkt te werken als interferon antagonist.

De aanvrager verzoekt de volgende werkzaamheden met deze vier categorieën chimere virussen omlaag te schalen:

In vitro werkzaamheden onderdeel 1

Onder onderdeel 1 worden (chimere) pneumovirussen geproduceerd in dierlijke cellen. De aanvrager is voornemens chimere pneumovirussen tot expressie te brengen in animale cellen uit alle vier de genoemde categorieën. Het betreft *in vitro* infectie experimenten met de chimere virussen. In de huidige vergunning zijn deze handelingen ingeschaald op ML-III niveau met als aanvullende voorschriften het dragen van handschoenen en uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II.

In vivo werkzaamheden onderdeel 2

In onderdeel twee worden kleine proefdieren (muizen, ratten, cavia's en hamsters) geïnfecteerd met (chimere) paramyxovirussen uit de genoemde categorieën. Het betreft *in vivo* experimenten met chimere paramyxovirussen in associatie met kleine proefdieren. In de huidige vergunning zijn deze handelingen ingeschaald op DM-III niveau met aanvullend voorschrift dat de dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator voorzien van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd om aerogene verspreiding van het virus te voorkomen.

In vitro werkzaamheden onderdeel 3

Handelingen met cellen en weefsels van de proefdieren vermeld bij onderdeel 2. In de huidige vergunning zijn deze handelingen ingeschaald op ML-III niveau met als aanvullend voorschrift het dragen van handschoenen en uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II.

De aanvrager verzoekt tot omlaagschaling van de werkzaamheden onder 1 t/m 3 van ML-III naar ML-II voor de *in vitro* experimenten en van DM-III naar DM-II voor de *in vivo* experimenten.

4. Risicobeoordeling van chimere virussen

Veel chimere virussen zijn verzwakt ten opzichte van de ouderorganismen. De COGEM is echter van mening dat niet in alle gevallen kan worden uitgesloten dat er een sterker, virulenter virus ontstaat met verhoogd of veranderd gastheertropisme. Daarom vindt zij een case by case beoordeling voor het inschalen van chimere virussen noodzakelijk.

De COGEM hanteert met betrekking tot het inschalen van chimere virussen van pathogeniteitsklasse 2 de regel $2 + 2 = 2$ tenzij. Als er te weinig bekend is over het uitgangsvirus, of er bewijzen of aanwijzingen zijn die het aannemelijk maken dat een bepaald type chimeer virus een hogere pathogeniteit of een andere (of uitgebreidere) gastheerspecificiteit zal hebben dan de natuurlijke oudervirussen wordt een hogere inschaling van de werkzaamheden geadviseerd.

4.1 Argumentatie aanvrager

De aanvrager beargumenteert zijn verzoek tot omlaagschaling met literatuur waaruit volgens hem blijkt dat chimere paramyxovirussen *in vitro* altijd geattenuëerd zijn. Dit geldt voor chimere virussen van RSV type A en B, van hMPV en RSV, van hMPV en APV, van hMPV en

parainfluenza virussen en van RSV en andere parainfluenzavirussen. Dit 'chimere effect' waarbij het chimere virus geattenuëerd is ten opzichte van de ouderorganismen treedt op bij:

- a)** uitwisseling van genen in de backbone van al geattenuëerde virussen (categorie 1 subtypes) (7,8,9,10)
- b)** uitwisseling van genen tussen verschillende virus subtypes (9,11,12)
- c)** uitwisseling van genen tussen virussen uit dezelfde genus (categorie 2 & 3) (13,14)
- d)** uitwisseling van genen tussen virussen uit verschillende genera (categorie 4) (15,16)

De aanvrager acht het zeer waarschijnlijk dat ook de vier categorieën chimere virussen die hij voornemens is te genereren dit chimere effect zullen vertonen en geattenuëerd zullen zijn.

De chimere virussen uit categorie 2 (uitwisseling van individuele genen en combinaties van APV genen in het wildtype hMPV backbone) zijn het minst gedefinieerd in de aanvraag. De aanvrager geeft aan dat vanuit de literatuur bekend is dat uitwisseling van de N, P en L genen (die coderen voor het polymerase complex) niet heeft geleid tot een verhoogde virulentie van de ontstane APV/hMPV chimeer (9, 12). Daarom valt volgens hem geen verhoogde virulentie te verwachten bij uitwisseling van andere individuele genen (M, F, G, SH, M2.1 en M2.2). Deze zijn te vergelijken met de combinatie N, P en L (verantwoordelijk voor RNA replicatie) als zijnde het polymerasecomplex. De aanvrager redeneert dat als zelfs uitwisseling van de gencombinatie N, P en L, samen het polymerasecomplex, geen verhoogde virulentie veroorzaakt, dit ook bijna niet te verwachten is bij uitwisseling van één van de andere genen. Uitwisseling van genen die functioneren als interferonantagonist hebben bij vergelijkbare virussen altijd geleid tot attenuatie en nooit tot verhoogde virulentie, aldus de aanvrager (16,17).

4.2 Overwegingen

De COGEM onderschrijft de conclusie van de aanvrager dat inmiddels meer bekend is over (chimere) metapneumovirussen, over de functies van de verschillende genen van deze virussen en tevens over de fenotypische eigenschappen van verschillende typen chimeren dan bij de initiële aanvraag in 2001 (9, 12, 14, 17). Op basis van nieuwe gegevens heeft de COGEM in 2003 al een aantal werkzaamheden met specifiek gedefinieerde chimere metapneumovirussen omlaag geschaald naar ML-II. De aanvrager onderbouwt zijn huidige verzoek tot omlaagschaling met literatuur waaruit zou blijken dat vergelijkbare chimere paramyxovirussen geattenuëerd zijn. De COGEM kan hier slechts ten dele mee instemmen.

De aanvrager geeft aan dat het artikel van Whitehead et al (1999) het verzoek tot omlaagschaling ondersteunt, omdat hierin aangetoond zou worden dat de uitwisseling van F en G eiwitten tussen RSV subtypes A en B leidt tot attenuatie. Hierbij wordt verwezen naar de attenuatie in dierexperimenten met 'cotton rats' en het feit dat recombinant wildtype rAB minder goed repliceert dan het uitgangsvirus wildtype A2. Echter elders in het artikel blijkt een discrepantie in de resultaten tussen de experimenten met 'cotton rats' en chimpansees. Het wildtype rAB bleek in

'cotton rats' inderdaad aanmerkelijk geattenuëerd ten opzichte van de A en B wildtype virussen. Echter, in chimpansees replicateerde het chimere virus beter dan het uitgangsvirus wildtype B1, maar slechter dan het uitgangsvirus wildtype A2. Met andere woorden was het niveau van replicatie van het chimere virus van eenzelfde orde als het replicerend vermogen van beide oudervirussen. Het replicerend vermogen is een indicatie voor virulentie, maar hierbij spelen ook andere factoren een rol zoals ontstaan van immuniteit, productie van toxines en invasiviteit (17). Whitehead en collega's concluderen dat de cotton rat geen geschikt proefmodel is voor AB chimere virussen wanneer extrapolatie naar de mens het doel is. Immers in proefdieren die nauwer verwant zijn aan de mens (chimpansee) blijkt dat het virus niet geattenuëerd is.

Verder wordt een artikel van Pham et al (2005) door de aanvrager aangedragen ter onderbouwing van het chimere effect. Uit het artikel blijkt echter dat er verschillen bestaan tussen de data verkregen in een onnatuurlijk gastheermodel (hamster) en een meer geëigend model, de 'African green monkey'. In het laatste proefdiermodel blijkt recombinant rHMPV-Na (hMPV voorzien van een AMPV N gen) vrijwel even goed te repliceren als rHMPV.

De COGEM concludeert dat uit de artikelen van Whitehead *et al* en Pham *et al* blijkt dat er bij de productie van chimere metapneumovirussen een nieuw virus kan ontstaan dat even replicatiecompetent, en mogelijk even fit en pathogeen is als het uitgangsvirus. De COGEM is derhalve van mening dat de door de aanvrager overlegde gegevens onvoldoende onderbouwing leveren om aan te nemen dat chimere metapneumovirussen in alle gevallen geattenuëerd zullen zijn ten opzichte van het uitgangsorganisme. Echter, uit de beschikbare gegevens blijkt ook niet dat er bij chimere metapneumovirussen sprake is van een verhoogde virulentie of pathogeniteit ten opzichte van de oudervirussen (8).

Wildtype metapneumovirussen zijn ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2 en veroorzaken bij infectie respiratoire symptomen. Er bestaan geen mogelijkheden tot profylaxe of therapie. Echter, in vrijwel alle gevallen gaat een infectie met metapneumovirussen vanzelf over. Studies hebben aangetoond dat vrijwel alle kinderen in Nederland een hMPV infectie hebben doorgemaakt als zij de leeftijd van 5 jaar bereiken. Het virus circuleert al geruime tijd in de humane populatie en herinfectie komt regelmatig voor. In het geval van een *worst case scenario* zou een chimeer metapneumovirus via besmetting van een onderzoeksmedewerker uit ML-II laboratorium-omstandigheden kunnen ontsnappen en zich blijvend in de populatie kunnen vestigen. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat dit virus echter virulenter of pathogener is dan het uitgangsorganisme dat al jaren in de populatie circuleert.

De voorgenomen werkzaamheden in onderliggende aanvraag betreffen uitsluitend klasse-2 organismen en combinaties van deze klasse 2-organismen. De gastheerspecifieke functie van een aantal paramyxoviruseiwitten maakt het niet aannemelijk dat deze eiwitten in een andere species functioneel is. Er is inmiddels veel onderzoek gedaan naar tropismevarianten van paramyxovirussen met als resultaat dat er geen "onverwachte" virulentieovergangen of tropismevarianten bekend zijn. Op basis van de beschikbare informatie zijn er geen aanwijzingen dat de voorgenomen uitwisseling van genen waardoor chimere metapneumovirussen

zullen ontstaan tot een virus zullen leiden waarvan de pathogeniteit hoger ligt dan het uitgangsorganisme van pathogeniteitsklasse 2.

5. Conclusie

De COGEM adviseerde eerder om handelingen met chimere virussen bestaande uit hMPV en andere pneumovirussen één inperkingsniveau hoger in te schalen (ML-III) dan op basis van de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen (klasse 2) verwacht mocht worden. De reden hiervoor was dat het destijds een relatief onbekend virus betrof waardoor de mogelijke risico's van handelingen met het virus moeilijk in te schatten waren. Inmiddels is meer bekend over deze virussen en hun eigenschappen. Op basis van de aangeleverde informatie zijn er geen aanwijzingen dat de voorgenomen uitwisseling van genen waardoor chimere metapneumovirussen zullen ontstaan, tot een virus zullen leiden waarvan de pathogeniteit hoger ligt dan het uitgangsorganisme van pathogeniteitsklasse 2.

Daarmee komen de eerdere argumenten en onduidelijkheden die ten grondslag lagen aan het tenzij argument te vervallen en is de 2+2 =2 regel van toepassing. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden voor *in vitro* experimenten op ML-II niveau en voor *in vivo* experimenten op DM-II niveau in te schalen, zoals gesteld in de conceptbeschikking.

6. Minderheidsstandpunt

Drie COGEM leden kunnen niet instemmen met het advies voor omlaagschaling naar ML-II en DM-II en hebben gevraagd een minderheidsstandpunt op te nemen in dit advies. In hun overweging telt zwaar dat het hier virussen betreft die direct overdraagbaar zijn op de mens via aerosolen e.d., dat chimere metapneumovirussen niet altijd geattenuëerd zijn, en dat er geen sprake lijkt van blijvende immuniteit tegen metapneumovirussen in de bevolking.

Het onderzoek dat door de aanvrager wordt aangehaald ter onderbouwing wijst uit dat er wel chimere paramyxovirussen kunnen ontstaan die even replicatiecompetent, fit en pathogeen zijn als het uitgangsvirus in een proefdiermodel dat nauw verwant is aan de natuurlijke gastheer (de mens). De beweringen van de aanvrager dat chimere virussen per definitie geattenuëerd zijn (het 'chimere effect') zijn derhalve niet houdbaar. Uit de *in vivo* experimenten met chimere metapneumovirussen blijkt dat er grote verschillen zijn tussen verschillende proefdiermodellen waardoor een extrapolatie naar de effecten bij de mens moeilijk te maken is. Verder worden er binnen de voorgenomen werkzaamheden chimere virussen gegenereerd die volledig replicatiecompetent zijn in de mens. Het betreft een virus met als natuurlijke gastheer de mens dat bovendien een eenvoudige en efficiënte transmissieroute kent via aerosolen en 'fomites'¹. Hoewel de meeste mensen in hun vroege jeugd al een infectie met metapneumovirussen hebben doorgemaakt, komt herinfectie regelmatig voor en lijkt immuniteit tegen dit virus slechts van tijdelijke aard.

¹ 'fomites' (oorzaak van overbrengen van ziekten): elk voorwerp of materiaal dat als drager en daardoor overbrenger van infectieuze organismen kan optreden. Voorbeelden zijn kleding, haar, beddengoed, handdoeken, dweilen, stethoscopen, injectienaalden, deurknoppen etc.

De leden die een minderheidsstandpunt hebben ingenomen vinden het onacceptabel als een door de mens gemaakt replicatiecompetent niet-geattenuëerd chimeer virus zich zou kunnen verspreiden en vestigen in de humane populatie. Om deze redenen achten deze leden de handhaving van de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met de vier categorieën chimere paramyxovirussen op inperkingsniveau ML-III noodzakelijk. Omlaagschaling van werkzaamheden naar ML-II niveau is alleen mogelijk indien attenuatie van de chimere virussen in de mens voldoende aannemelijk is gemaakt. Dit betekent dat alleen werkzaamheden met chimere virussen waarbij de backbone attenuerende mutaties bevat en deze attenuaties niet opgeheven worden door complementatie door een ingebracht nieuw gen volgens deze leden op ML-II niveau kunnen worden ingeschaald.

6.1 Signalering

Enkele van de leden die niet kunnen instemmen met de voorgestelde omlaagschaling hebben opgemerkt dat in het geval van een *worst case scenario* (ggo virus ontsnapt uit laboratorium en vestigt zich in de humane populatie) dit, zelfs wanneer er geen nadelige gevolgen zijn voor de volksgezondheid, schade kan berokkenen aan het werkveld en het vertrouwen in bestaande veiligheidsmaatregelen en de overheid. Dit vormde voor hen een aanvullende overweging om de huidige inschaling op ML-III/DM-III niveau te handhaven.

Referenties

- 1) Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
- 2) Boivin G, *et al.* (2002). Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 186: 1330-1334
- 3) Stockton J, *et al.* (2002). Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 8: 897-901
- 4) Van den Hoogen BG, *et al* (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease *Nat Med* 7: 719-724
- 5) COGEM (2001) Advies kennisgeving GGO 01-154 (CGM/011212-01)
- 6) COGEM (2003) Advies GGO 01-154/2 (CGM/030205-01)
- 7) Jin, H. *et al* (2000), recombinant Respiratory Syncytial Viruses with deletions in the NS1, NS2, SH and M2-2 genes are attenuated in Vitro and in Vivo. *Virology* 273: 210-218
- 8) Whitehead SS, *et al* (1999) Replacement of the F and G proteins of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A with those of subgroup B generates chimeric live attenuated RSV subgroup B vaccine candidates. *J. of Virology* 73, 9773-9780
- 9) De Graaf M, *et al* (2008) Specificity and functional interaction of the polymerase complex proteins of human and avian metapneumoviruses. *J. of Gen. Virology* 89: 975-983
- 10) Jin H, *et al* (1998) Recombinant Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) from cDNA and construction of Subgroup A and B chimeric RSV. *Virology* 251: 206-214

- 11) Buchholz UJ *et al* (2000) Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV); effects on host range and evaluation as a live attenuated hRSV vaccine. *J. of Virology* 74, 1187-1199
- 12) Pham QN *et al* (2005) Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frames replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *J. of Virology* 79m 15114-15122
- 13) Durbin A *et al* (2000) Human parainfluenza Virus Type 3 (PIV3) expressing the Hemagglutinin Protein of Measles Virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J. of Virol.* 74, 6821 – 6831
- 14) Tran K. *et al* (2007) Replacement of the respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 by the V protein of parainfluenza virus 5. *Virology* 368, 73-82
- 15) Skiadopoulos *et al* (1999) Generation of parainfluenza virus type 1 vaccine candidate by replacing the HN and F glycoproteins of the live attenuated PIV3 cp45 vaccine virus with their PIV1 counterparts. *Vaccine* 18: 503-510
- 16) Tao T *et al* (2000) Replacement of the ectodomains of the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins of recombinant parainfluenza virus type 3 (PIV3) with their counterparts from PIV2 yields attenuated PIV2 vaccine candidates. *J. of Virol.* 74, 6448-6458
- 17) Bossert & Conzelman (2002) Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural proteins (NS) as host range determinants; a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon competent bovine cells. *J. of Virol.* 76; 4287 – 4293
- 18) Casadevall A & Pirofski L. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenity. *Infection and immunity* vol. 67, no. 8; 3703-3713