

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

TEL.: 030 274 2777  
FAX: 030 274 4476  
INFO@COGEM.NET  
WWW.COGEM.NET

**DATUM** 22-03-2011  
**KENMERK** CGM/110322-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling productie genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*

Geachte heer Atsma,


Naar aanleiding van een adviesvraag over een verzoek tot wijziging van de vergunning 'Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus* (RVFV)' van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

*Rift Valley fever virus* (RVFV) is ziekteverwekkend voor mens en dier en is geclassificeerd als klasse 3 pathogeen. Ziekte en sterfte onder landbouwhuisdieren is hoog. Besmetting bij dieren vindt voornamelijk plaats via muggen. Humane besmetting wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door contact met bloed, weefsel of organen van geïnfecteerde dieren. Ook inhalatie van aërosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden heeft geresulteerd in humane infecties.

De aanvrager wil infectieus niet-spreidend genetisch gemodificeerd (gg) RVFV produceren dat als basis kan dienen voor het ontwikkelen van combinatievaccins. De aanvrager wil het gg-RVFV deeltje combineren met (glyco)proteïnen van het *Influenza A virus*, *Pestes-des-petits-ruminants virus* (PPRV), *Vesicular stomatitis virus* (VSV) of *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV) of daarvan afgeleide mutanten. Daarnaast wil de aanvrager ratten, muizen en schapen infecteren of vaccineren met compleet RVFV en infectieus niet-spreidend (gg)-RVFV waarbij het niet-spreidende gg-RVFV deeltje al dan niet eiwitten van het *Influenza A virus* en fluorescerende eiwitten zal bevatten. Na vaccinatie zullen de dieren op immuniteit getest worden met wildtype RVFV, *Influenza A virus* en PPRV getest.

Omdat de COGEM niet kan uitsluiten dat tijdens de productie van niet-spreidend gg-RVFV vol-virulent gg-RVFV geformeerd wordt, adviseert zij de productie uit te voeren onder ML-III inperking. Handelingen met proefdieren in associatie met niet-spreidend en spreidend (gg-) RVFV adviseert de COGEM uit te voeren onder DM-III inperking onder het aanvullende voorschrift dat medewerkers volledig beschermende kleding en een volgelaat masker dragen zoals beschreven in de aanvraag. Daarbij dient het masker aan aanvullende specificaties te voldoen. Onder de genoemde inperkingsniveaus en aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij handelingen met gg-RVFV al dan niet in associatie met proefdieren voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,



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

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

*Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. R.J. de Groot, dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Advies inschaling productie genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*

COGEM advies CGM/110322-01

## Inleiding

De COGEM is door het ministerie van Infrastructuur en Milieu gevraagd te adviseren over een verzoek tot wijziging van de vergunning getiteld 'Ontwikkeling van een veilig en effectief DIVA vaccin voor *Rift Valley fever virus*' (IG 07-150). Het verzoek is ingediend door de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Veterinair Instituut van het Wageningen UR.

### *Rift Valley fever virus*

Het *Rift Valley fever virus* (RVFV) is voor het eerst in 1931 geïdentificeerd bij schapen in de Rift vallei in Kenia. Inmiddels is bekend dat het virus endemisch is in verschillende Afrikaanse landen. In 2000 heeft het virus zich ook in de Arabische landen gemanifesteerd. RVFV is primair infectieus voor landbouwhuisdieren (schapen, geiten, koeien en kamelen) wat kan leiden tot grote economische schade. Tevens kan het virus mensen infecteren.<sup>1,2,3</sup>

Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen zoals koorts, hoofdpijn en spierpijn. Een klein deel van de patiënten (1%) ontwikkelt ernstiger verschijnselen zoals oogontsteking, hemorrhagische koorts of hersen- en ruggenmergontsteking.<sup>1,2</sup> Bij dieren zijn in het bijzonder schapen vatbaar voor het virus. Indien lammeren worden geïnfecteerd, overlijdt 90%. Voor geïnfecteerde volwassen schapen bedraagt de mortaliteit 10%. Indien drachtige schapen worden geïnfecteerd is de kans dat abortus optreedt bijna 100%.<sup>1,2</sup>

Het virus wordt onder dieren voornamelijk verspreid door verschillende muggensoorten.<sup>1,3</sup> In dierexperimenteel onderzoek is aangetoond dat horizontale overdracht van RVFV tussen schapen ook zonder tussenkomst van vectoren mogelijk is. De schapen bleken het virus via hun neus en oren uit te scheiden.<sup>4</sup> Onder mensen vindt besmetting voornamelijk plaats via direct of indirect contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren.<sup>1,2,3</sup> Ook inhalatie van aerosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden heeft geresulteerd in humane infecties.<sup>2</sup> Tevens zijn humane infecties door muggenbeten gerapporteerd.<sup>2,3</sup> Tot op heden zijn er geen situaties beschreven dat het virus rechtstreeks van mens tot mens werd overgedragen.<sup>2,3</sup>

### *Genomische organisatie van RVFV*

RVFV is een enkelstrengs (-) RNA virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie *Bunyaviridae*. Het genoom bestaat uit drie segmenten: het small (S), medium (M) en large (L) segment.<sup>5</sup> Het S-segment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de RNA genoomsegmenten het zogenaamde 'nucleocapside'. Daarnaast codeert het S-segment voor het niet-structureel eiwit NSs dat betrokken is bij blokkering van interferon genexpressie. Dit eiwit is niet essentieel voor de levensvatbaarheid van het virus.<sup>6,7</sup> Het M-segment codeert voor de glycoproteïnen Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in

het membraan van het virus, waardoor het virus aan doelwitcellen kan binden. Deze interactie faciliteert de opname van het virus in de cel. Het L-segment codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese. Eiwitten L en N zijn essentieel voor RVFV replicatie.

Aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten van RVFV bevinden zich sequenties die niet coderen voor een eiwit, de zogenaamde 'untranslated regions' of UTR's. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTR's verschillend in lengte en nucleotide volgorde. De aanvrager geeft aan dat voor ieder genoomsegment de bijbehorende UTR's essentieel zijn voor replicatie van dat betreffende genoomsegment en voor het inpakken in virus partikels.

### **De voorgenumen werkzaamheden**

#### *(Her)infectie van proefdieren met volledig gg-RVFV*

De aanvrager beschikt over een vergunning voor het (her)infecteren van kleine proefdieren (rat en muis) met vol-virulent gg-RVFV en wildtype RVFV. De vergunning is verleend onder DM-III inperkingsniveau met het aanvullende voorschrift dat de proefdieren in onderdrukisolatoren gehuisvest zijn. De aanvrager wil ook schapen gaan (her)infecteren en verzoekt daarom tot uitbreiding van de huidige vergunning. Daarnaast wil hij huisvesting van proefdieren in onderdrukisolatoren achterwege laten.

#### *Productie van niet-spreidend gg-RVFV met heterologe eiwitten*

De aanvrager wil infectieuze niet-spreidende gg-RVFV deeltjes gaan gebruiken als basis voor het ontwikkelen van verschillende soorten combinatievaccins. De virusdeeltjes zullen het volledige L- en S-genoomsegment bevatten, maar het M-genoomsegment missen. Voor productie van virusdeeltjes ten behoeve van dit vaccinplatform wordt gebruik gemaakt van twee transcriptieplasmiden die coderen voor de RVFV L- en S-genoomsegmenten. De eiwitten die oorspronkelijk door het M segment worden gecodeerd, worden voor de productie van gg-RVFV deeltjes door middel van een stabiele of transiënte expressie van een apart expressieplasmide aangeboden. Dit expressieplasmide zal geen UTR's bevatten, waardoor het M-segment tijdens de productie niet kan repliceren en niet kan worden ingepakt in het virusdeeltje. Op deze wijze wordt een infectieus virusdeeltje geproduceerd dat replicatiecompetent is (want het deeltje bevat de twee complete genoomsegmenten L en S) maar zich niet kan verspreiden wegens het ontbreken van een volledig M genoomsegment.

Om de niet-spreidende virusdeeltjes zichtbaar te kunnen maken, wil de aanvrager tevens gebruik maken van een reporter 'minigenoom' dat in het virusdeeltje ingepakt moet worden. Deze minigenomen zullen een reporter gen voor luciferase of een fluorescerend eiwit bevatten. De uiteinden van het minigenoom bevatten de UTR's van het L-, S- of M-genoomsegment.

Voor het ontwikkelen van de combinatievaccins gebruikt de aanvrager twee benaderingswijzen. Enerzijds wil de aanvrager een L-, S- of M-minigenoom ontwikkelen waarbij in een transcriptieplasmide het gen is gekloneerd dat codeert voor het ectodomein van het haemagglutinine (sHA) of van het neuraminidase (sNA) van het *Influenza A virus* H1N1. Het

minigenoom wordt samen met de L- en S- genoomsegmenten in het gg-RVFPV deeltje ingepakt. Dit resulteert in een niet-spreidend infectieus gg-RVFPV virusdeeltje dat, afhankelijk van het type minigenoom, twee of drie RNA-segmenten bevat. Het door het minigenoom tot expressie gebrachte sHA en sNA bevat geen transmembraananker en wordt in de cel uitgescheiden.

Anderzijds wil de aanvrager expressieplasmiden ontwikkelen die coderen voor glycoproteïnen niet-gerelateerd aan RVFPV. Het betreft glycoproteïnen van het *Influenza A virus* H1N1 (HA of NA), het *Pestes-des-petits-ruminants virus* (PPRV; H of F eiwit), het *Vesicular stomatitis virus* (VSV; G eiwit) en het *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV; Gn en Gc eiwitten) De aanvrager wil onderzoeken of deze glycoproteïnen de functie van de door het RVFPV M segment gecodeerde eiwitten kunnen overnemen. Coderende genen worden *in trans* aangeboden en door middel van stabiele of transiënte expressie van een apart expressieplasmide tot expressie gebracht. Dit expressieplasmide zal geen UTR's bevatten, waardoor het geproduceerde mRNA niet gerepliceerd wordt en niet kan worden ingepakt in het virusdeeltje. Door cotransfecties uit te voeren met transcriptieplasmiden die coderen voor de genoomsegmenten L en S en een expressieplasmide dat codeert voor de hierboven genoemde glycoproteïnen of daarvan afgeleide mutanten, worden niet-spreidende gg-RVFPV deeltjes geproduceerd die het S en L genoomsegment van RVFPV bevatten en daarnaast de hierboven genoemde glycoproteïnen tot expressie brengen. De aanvrager geeft aan dat tijdens deze experimenten geen (deel van het) RVFPV M genoomsegment aanwezig zal zijn.

#### *Vaccinatie van proefdieren met niet-spreidend gg-RVFPV*

De aanvrager wil ratten, muizen en schapen vaccineren met de hiervoor beschreven infectieuze niet-spreidende gg-RVFPV deeltjes die al dan niet zichtbaar gemaakt zijn met reportereiwitten en al dan niet de sNA of sHA eiwitten van het *Influenza A virus* en daarvan afgeleide gemuteerde eiwitten tot expressie brengen. Na vaccinatie zal de aanvrager de proefdieren op verschillende tijdstippen besmetten met wildtype RVFPV, *Influenza A virus* en PPRV. Zowel vaccinatie als besmetting zullen via verschillende routes plaatsvinden.

#### **Eerder advies**

Naar aanleiding van dezelfde vergunning heeft de COGEM eerder advies uitgebracht over RVFPV en werkzaamheden met gg-RVFPV.<sup>8</sup> De COGEM heeft geadviseerd het virus te classificeren als een klasse 3 pathogeen. Transfecties van animale cellen die niet kunnen leiden tot het ontstaan van replicatiecompetent RVFPV, heeft zij geadviseerd uit te voeren op ML-II niveau in een veiligheidskabinet klasse II met inachtneming van aanvullende voorschriften. Experimenten met infectieus spreidend gg-RVFPV, al dan niet in associatie met proefdieren (ratten en muizen) is geadviseerd uit te voeren op ML-III dan wel DM-III niveau met inachtneming van aanvullende voorschriften.

Daarnaast heeft de COGEM recent geadviseerd over classificatie en werkzaamheden met gg-*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV).<sup>9</sup> CCHFV behoort net als RVFPV tot de familie *Bunyaviridae*, maar valt onder een ander genus. De COGEM adviseerde het virus te classificeren als klasse 4 pathogeen. Werkzaamheden met niet-spreidend replicatiecompetent

(gg)-CCHFV werden geadviseerd uit te voeren onder ML-III of ML-IV inperkingsniveau, al dan niet onder bepaalde voorwaarden en aanvullende voorschriften.

## **Overweging en advies**

### *(Her)infectie van proefdieren met vol-virulent gg-RVfV*

De belangrijkste wijze waarop bij dieren besmetting en overdracht van RVfV plaatsvindt, is via muggen. Humane besmetting met RVfV vindt plaats via inademen of inname van aërosolen of door direct of indirect contact met bloed of organen van geïnfecteerde dieren. Directe overdracht van mens op mens is nooit beschreven. Na het infecteren van proefdieren met (gg-) RVfV zullen de meest risicovolle handelingen waarbij (gg-)RVfV mogelijk vrijkomt, bestaan uit het afnemen van bloed en het verrichten van secties.

De huidige vergunning is verleend onder DM-III inperkingsniveau waarbij de proefdieren in onderdrukisolatoren gehuisvest zijn. Door deze huisvesting zijn de medewerkers beschermd wanneer bij open handelingen het (gg-)RVfV eventueel vrij komt. Indien proefdieren niet gehuisvest zijn in onderdrukisolatoren, is de COGEM van mening dat bij open handelingen met (gg-)RVfV, de medewerker maximaal beschermd moet zijn om contactbesmetting (bijvoorbeeld via de ogen) of besmetting via inademen van aërosolen te voorkomen. Maximale bescherming van de medewerker kan bereikt worden door, zoals in de aanvraag vermeld, volledige sluitende kleding en een volgelaat masker te dragen. Daarbij dienen de specificaties van het masker niet onder te doen voor de specificaties van een onderdrukisolator. Tevens dient getest te worden dat het masker op het gezicht van de medewerker past en geheel sluit. Onder de hierboven gestelde voorwaarden is de COGEM van mening dat onder DM-III inperkingsniveau het voorkómen van verspreiding van (gg-)RVfV naar het milieu voldoende gewaarborgd is en de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### *Productie van niet-spreidend gg-RVfV met heterologe eiwitten*

De aanvrager wil sNA of sHA van *Influenza A virus*, al dan niet in combinatie met reporter-eiwitten, met behulp van een minigenoomsegment tot expressie brengen in infectieuze niet-spreidende replicatiecompetente gg-RVfV deeltjes. Afhankelijk van het type minigenoom bevat deze de UTR's van het L-, S- of M-genoomsegment.

Indien gebruik wordt gemaakt van een M-minigenoomsegment en er aan weerszijden van de M-segment coderende sequentie in het expressieplasmide sequenties aanwezig zijn die overlappen met de UTR's van het M-minigenoomsegment, is het mogelijk dat er homologe recombinatie optreedt. De aanvrager geeft aan dat overlappende sequenties ontbreken. Echter, de exacte sequenties van de te gebruiken constructen worden, ook na nadrukkelijk verzoek, niet door de aanvrager aangeleverd zodat de COGEM dit niet kan verifiëren. Bovendien draagt de aanvrager geen experimentele gegevens aan die bevestigen dat homologe combinatie niet optreedt. De COGEM kan daarom niet uitsluiten dat er homologe recombinatie optreedt waardoor zij niet kan uitsluiten dat er infectieus spreidend gg-RVfV ontstaat.

Daarnaast beredeneert de aanvrager aan de hand van een theoretische beschouwing dat heterologe recombinatie niet kan optreden. Hij overlegt geen experimentele gegevens die dit

bevestigen. Bij positief-strengs RNA virussen als de alphavirussen en pestvirussen is heterologe RNA recombinatie een bekend verschijnsel.<sup>10,11,12</sup> Ook voor de familie van *Bunyaviridae* is heterologe RNA recombinatie gerapporteerd.<sup>13,14</sup> Zoals blijkt uit een publicatie over het *Bunyamwera virus* is het moeilijk om replicerend virus te formeren als een van de drie genoomsegmenten de UTR's bevat van een ander genoomsegment, waardoor twee verschillende genoomsegmenten dezelfde UTR's bezitten.<sup>15</sup> Het is echter niet onmogelijk. In een enkele situatie werd autonoom replicerend *Bunyamwera virus* gecreëerd, al was het resulterende virus wel verzwakt ten opzichte van het uitgangsvirus. De COGEM acht de kans zeer klein dat als gevolg van heterologe recombinatie spreidende RVFV deeltjes kunnen ontstaan maar kan dit niet uitsluiten. Echter, de kans dat een dergelijk gg-RVFV deeltje virulenter is dan het wildtype RVFV van waaruit het deeltje gegenereerd is, acht zij verwaarloosbaar klein. Bij recombinatie zal namelijk maximaal weer een viraal deeltje ontstaan dat vergelijkbaar is met wildtype RVFV.

Bij de productie van niet-spreidend gg-RVFV met behulp van twee transcriptieplasmiden coderend voor de genoomsegmenten S en L en een expressieplasmide coderend voor een niet aan RVFV gerelateerd glycoproteïne, kan geen spreidend virus ontstaan omdat er volgens de aanvrager geen (deel van het) M-genoomsegment aanwezig is. De aanvrager geeft niet aan of en hoe het productiesysteem hier van te voren op wordt gecontroleerd. De COGEM merkt op dat contaminatie met het derde M-genoomsegment kan optreden door insleep van plasmide DNA of andere menselijke fouten.

RVFV is een klasse 3 pathogeen. Conform de regeling GGO volgt hieruit dat werkzaamheden met spreidend (gg-)RVFV uitgevoerd moeten worden onder ML-III inperkingsniveau.<sup>16</sup> Aangezien de COGEM niet kan uitsluiten dat er in het door de aanvrager toegepaste productiesysteem ten gevolge van recombinatie of contaminatie met M genoomsegment volledig gg-RVFV ontstaat, adviseert zij de productie van niet-spreidend gg-RVFV uit te voeren onder ML-III inperkingsniveau.

#### *Vaccinatie van proefdieren met niet spreidend gg-RVFV*

De aanvrager wil proefdieren vaccineren met niet-spreidend gg-RVFV. Zoals hierboven toegelicht, kan de COGEM niet uitsluiten dat tijdens de productie van niet-spreidend gg-RVFV vol-virulent gg-RVFV is gegenereerd. Tevens kan de aanvrager niet uitsluiten dat tijdens de challenge experimenten met wildtype RVFV niet-spreidend gg-RVFV in het proefdier aanwezig is. Door uitwisseling van genoomsegmenten tussen niet-spreidend gg- en wildtype RVFV kan vol-virulent gg-RVFV ontstaan waarin genen coderend voor fluorescerende reportereiwitten of voor sHA of sNA eiwitten van het *Influenza A virus* geïntegreerd zijn. De COGEM is van mening dat gezien de aard van de insertie in samenhang met het RVFV, geen eigenschappen worden toegevoegd die van invloed zijn op de pathogeniteit van RVFV. Daardoor kunnen er geen virussen ontstaan met een hogere virulentie of ander tropisme dan het virus waarmee de besmetting is uitgevoerd.

Om spreiding van gg-RVFV naar het milieu te voorkomen, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden met infectieus niet-spreidend gg-RVFV in associatie met proefdieren uit te voeren onder DM-III inperkingsniveau. Om daarbij de bescherming van de medewerker te waarborgen, adviseert zij volledig beschermende kleding en een volgelaat masker

te dragen zoals beschreven in de aanvraag. Daarbij dienen de specificaties van het masker niet onder te doen voor de specificaties van een onderdrukisolator. Tevens dient getest te worden dat het masker op het gezicht van de medewerker past en geheel sluit.

### **Conclusie**

Omdat de COGEM niet kan uitsluiten dat tijdens de productie van niet-spreidend gg-RVfV volledig gg-RVfV kan ontstaan, adviseert zij deze productie uit te voeren onder ML-III inperking.

Handelingen met proefdieren in associatie met niet-spreidend en spreidend (gg-) RVfV adviseert de COGEM uit te voeren onder DM-III inperking. Daarbij dient het aanvullende voorschrift in acht genomen te worden dat medewerkers volledig beschermende kleding inclusief volgelaat masker dragen zoals omschreven in de aanvraag. Daarbij dienen de specificaties van het masker niet onder te doen voor de specificaties van een onderdrukisolator. Tevens dient getest te worden dat het masker op het gezicht van de medewerker past en geheel sluit.

Onder de hier genoemde inperkingsniveaus en aanvullende voorwaarden acht de COGEM de risico's bij handelingen met gg-RVfV al dan niet in associatie met proefdieren voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### **Referenties**

1. The World Organisation for Animal Health (OIE). Disease Information Summaries Rift Valley fever. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/disease-information-summaries> (19-03-2011)
2. World Health Organization (WHO). Rift Valley fever virus: Factsheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/index.html> (19-03-2011)
3. Health Protection Agency (HPA). Rift Valley fever: Topic <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/RiftValleyFever/> (19-03-2011)
4. Busquets N *et al.* (2010). Experimental infection of young adult European Breed Sheep with *Rift Valley fever virus* field isolates. *Vector-borne and zoonotic diseases* 10(7):689-696
5. Nichol ST *et al.* (2005). Bunyaviridae. In: *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Edited by Fauquet CM *et al.*, Academic Press 695-716
6. Billecocq A, *et al.* (2004). NSs protein of *Rift Valley fever virus* blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of Virology* 78:9798-9806
7. Ikegami T *et al.* (2006). Rescue of infectious *Rift Valley fever virus* entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J. Virol.* 80(6):2933-2940
8. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVfV). CGM/080313-05
9. COGEM (2011). Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (RVfV). CGM/110321-01
10. Hajjou M *et al.* (1996). Nonhomologous RNA-RNA recombination events at the 3' nontranslated region of the Sindbis virus genome: hot spots and utilization of nonviral sequences. *J. Virol.* 70:5153-5164
11. Smerdou C and Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. *J. Virol.* 73: 1092-1098



12. Gallei *et al.* (2005). Noncytopathogenic pestivirus strains generated by nonhomologous RNA recombination: alteration in the NS4A/NS4B coding region. *J. Virol.* 79:14261-14270
13. Iroegbu CU and Pringle CR (1981). Genetic interactions among viruses of the Bunyamwera complex. *J. Virol.* 37(1):383-394
14. Heinze C *et al.* (2003). An unusual large intergenic region in the S-RNA of a Bulgarian tomato spotted wilt virus isolate. *Arch. Virol.* 148:199-205
15. Lowen AC *et al.* (2005). Attenuation of Bunyavirus replication by rearrangement of viral coding and noncoding sequences. *J. Virol.* 79:6940-6946
16. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen