

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

DATUM 17 april 2012
KENMERK CGM/120417-02
ONDERWERP Advies: werkzaamheden met VSIV/Ebolavirus en VSIV/Marburgvirus chimeren

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag met de titel 'Identificatie van gastheerfactoren voor Ebola en Marburg virus' van Stichting Het Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) Vesicular stomatitis Indiana virussen (gg-VSIVs) die in plaats van het VSIV manteleiwit, het manteleiwit van het Ebolavirus of het Marburgvirus bevatten. De aanvrager wil de gg-VSIVs gebruiken om de factoren die een rol spelen bij een infectie met het Ebolavirus of Marburgvirus te bestuderen.

VSIV is een belangrijk dierpathogeen dat grote schade kan toebrengen aan dierpopulaties, waaronder koeien, paarden en varkens. Op basis van de huidige wetenschappelijke kennis beschouwt de COGEM het VSIV als een klasse 3 dierpathogeen.

Gebaseerd op verschillende wetenschappelijke publicaties is de aanvrager van mening dat de gg-VSIVs verzwakt zijn ten opzichte van het oudervirus en geen ziekte veroorzaken in mensen en dieren. De COGEM merkt op dat in slechts één van deze studies een vergelijking wordt gemaakt tussen de pathogeniteit van het gg-VSIV en het wild-type VSIV. Hieruit kan de COGEM afleiden dat het gg-VSIV in muizen waarschijnlijk geattenuerd is ten opzichte van het uitgangsvirus. De overige studies suggereren slechts dat het gg-VSIV beperkt pathogeen is onder de geteste omstandigheden, maar leveren door gebrek aan juiste controles in de ogen van de COGEM geen bewijs, dat het gg-VSIV verzwakt is ten opzichte van het wildtype VSIV. Op basis van een *casestudie* met één persoon kan de COGEM niet concluderen dat het gg-VSIV apathogeen is in mensen. Bovendien ontbreken gegevens over de pathogeniteit van de gg-VSIV's in de natuurlijke gastheer van VSIV.

Door genoemde vervanging van het VSIV manteleiwit acht de COGEM het waarschijnlijk dat het gastheerbereik van de gg-VSIVs beperkt is. Er zijn echter geen gegevens gepubliceerd over de infectiviteit van of verspreiding onder dieren, die onderbouwen dat het gg-VSIV als verzwakt aangemerkt kan worden.

Op basis van het bovenstaande acht de COGEM de basis te smal om het gg-VSIV in pathogeniteitsklasse 2 in te delen en adviseert zij de werkzaamheden met betreffende gg-VSIVs op ML-III inperkingsniveau in te schalen. Op dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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

Inschaling van onderzoek naar Ebolavirus en Marburgvirus infecties met genetisch gemodificeerd VSIV

COGEM advies CGM/120417-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld: “Identificatie van gastheerfactoren voor Ebola en Marburgvirus’ van de Stichting Het Nederlands Kanker Instituut. De aanvrager wil *in vitro* experimenten uitvoeren met replicatiecompetent genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus* (gg-VSIV) dat het glycoproteïne van hetzij het *Zaire ebolavirus* hetzij het *Lake Victoria marburgvirus* bevat. Doel van deze experimenten is om gastheerfactoren die betrokken zijn bij een infectie met het Ebolavirus of Marburgvirus te kunnen identificeren en karakteriseren. Het gg-VSIV is vervaardigd in de VS. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren.

Vesicular stomatitis virus

VSV behoort tot het genus *Vesiculovirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*. Het genus *Vesiculovirus* omvat 10 verschillende virussoorten. De typespecies wordt gevormd door het Indiana serotype. Vesiculovirussen infecteren vooral zoogdieren en vissen, maar kunnen in endemische gebieden ook vogels en reptielen infecteren.¹ De virussen worden overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren of via inhalatie van besmette aërosolen.²

VSV is enzoötisch in Mexico, Centraal Amerika, het noordelijk deel van Zuid-Amerika en Oost-Brazilië. Het virus veroorzaakt de ziekte ‘vesicular stomatitis’ in vee, waaronder paarden en varkens.³ Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren en lijkt daarmee sterk op mond- en klauwzeer.⁴ Hoewel de mortaliteit in dieren zeer laag is, bestaat er nog geen specifieke behandeling tegen de ziekte.⁴ De meeste dieren die geïnfecteerd raken met VSV herstellen binnen twee weken.⁴ Opgemerkt moet worden dat een uitbraak van VSV grote economische schade tot gevolg kan hebben.

VSV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren of via blootstelling aan het virus in het laboratorium.^{2,3} De meeste humane infecties verlopen zonder klinische verschijnselen. Mensen die wel ziek worden, ontwikkelen in eerste instantie hoge koorts gevolgd door griepachtige symptomen, waaronder hoofdpijn, misselijkheid, spierpijn en gewrichtspijn. De ziekte duurt doorgaans drie tot zes dagen en wordt niet geassocieerd met complicaties of sterfte.³ Verspreiding tussen mensen onderling is tot op heden niet in de literatuur gerapporteerd.⁵ Er is nog geen specifieke behandeling van patiënten voorhanden. De behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding.

Het VSV genoom

Het VSV heeft een enkelstrengs RNA genoom van negatieve strengs. Het genoom codeert voor vijf structurele eiwitten: het zogenaamde nucleoproteïne (N-eiwit), het phosphoproteïne (P-eiwit), het matrixproteïne (M-eiwit), het glycoproteïne (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).² Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje. De N, L en P eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie.³ Het G-eiwit bevindt zich in het lipidemembraan en is verantwoordelijk voor de verankering aan en fusie met de gastheer cel.² Het M-eiwit heeft een belangrijke rol in de constructie van het virus, het verlaten van de cel door budding en apoptose van de cel.³

Filoviridae

Het Ebolavirus en Marburgvirus behoren tot de familie der *Filoviridae*. Deze negatief enkelstrengs RNA virussen zijn endemisch in Centraal-Afrika en veroorzaken een zeer ernstige vorm van hemorragische koorts in mensen en niet-menselijke primaten die in bijna negentig procent van de gevallen een dodelijke afloop kent.¹ De ziekte presenteert zich over het algemeen acuut waarbij symptomen als algehele malaise, koorts, hoofdpijn en myalgie optreedt. Daarnaast zijn er meestal andere symptomen aanwezig zoals keelpijn, misselijkheid, braken, buikpijn, diarree, pijn op de borst en hoesten. Rond de vijfde ziektedag kunnen er puntvormige huidbloedingen, bloeduitstortingen onder de huid en mucosale bloedingen optreden. Sterfte treedt doorgaans op in de tweede week na besmetting.⁶

Vanwege de hoge virulentie, de afwezigheid van effectieve therapie en het feit dat transmissie via aerosolen kan plaatsvinden worden deze virussen geclassificeerd als klasse 4 humaan pathogenen.^{6,7}

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil gastheerfactoren betrokken bij een infectie met het Ebolavirus of Marburgvirus identificeren en karakteriseren. Dit wil hij bereiken door eerder vergunde animale cellen of cellijnen te infecteren met replicatiecompetente gg-VSIV die vervaardigd zijn in de Verenigde Staten. Het VSIV wordt in de VS als een klasse 2 pathogeen beschouwd. In het gg-VSIV is het gen dat codeert voor de virale glycoproteïne vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus. Tevens is de coderende sequentie voor het Green Fluorescent Protein (GFP) in het genoom van deze virusdeeltjes ingebouwd.

Uit de geïnfecteerde cellen zal RNA en eiwit worden geïsoleerd voor kwantitatieve RT-PCR of Western blot analyse. De geïnfecteerde cellen zullen na fixatie worden geanalyseerd met behulp van microscopie of Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS). De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uitvoeren.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in augustus 2011 geadviseerd over de classificatie van VSV en over vergelijkbare werkzaamheden met gepseudotyperde gg-VSV vectoren (uitgangsstam VSV Indiana - San Juan). Ook in dit geval betrof het replicatiecompetente virusdeeltjes, waarvan het

gen dat codeert voor de virale glycoproteïne was vervangen door een sequentie die codeert voor fusie-eiwitten afkomstig uit *Influenzavirus A*, coronavirussen, rhabdovirussen, paramyxovirussen, bunyavirussen, *Nairovirus*, *Hantavirus* en baculovirussen.

De COGEM heeft het VSIV destijds geïnclassificeerd als een klasse 3 dierpathogeen, omdat de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn.⁸ Conform deze inschaling en het feit dat een eventuele omlaagschaling van de laboratoriumstam VSV Indiana-San Juan onvoldoende onderbouwd was, heeft de COGEM geadviseerd de betreffende werkzaamheden met gg-VSV op ML-III niveau in te schalen.

Overweging

Classificatie

VSIV is een belangrijk dierpathogeen dat grote schade kan toebrengen aan dierpopulaties, waaronder koeien, paarden en varkens. Omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen, niet enzoötisch aanwezig is en er geen profylaxe of therapie beschikbaar is, kunnen de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk zijn. Op basis van de huidige wetenschappelijke kennis ziet de COGEM geen reden om haar eerdere classificatie van VSIV als klasse 3 dierpathogeen te herzien.

De aanvrager wil gebruik maken van een chimeer virus dat is opgebouwd uit delen van het VSIV en het *Zaire ebolavirus* of het *Lake Victoria marburgvirus*. 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.

Voor de classificatie van chimere virussen die opgebouwd zijn uit twee klasse 3 virussen hanteert de COGEM de regel dat de chimere virussen als een klasse 3 pathogeen worden beschouwd, tenzij er bewijzen of aanwijzingen zijn die het aannemelijk maken dat een bepaald type chimeer virus een gewijzigde pathogeniteit of een aangepaste gastheerspecificiteit zal hebben ten opzichte van de natuurlijke oudervirussen. *In vitro* werkzaamheden met een pathogeniteitsklasse 3 gg-virus worden, conform de Regeling ggo ingeschaald op ML-III inperkingsniveau.

In onderhavige vergunningaanvraag wordt gebruik gemaakt van chimere virussen die zijn opgebouwd uit een virus die de COGEM als pathogeniteitsklasse 3 dierpathogeen beschouwd en een pathogeniteitsklasse 4 virus. Volgens genoemde regel zouden laboratoriumwerkzaamheden met deze chimere virussen minimaal op ML-III inperkingsniveau ingeschaald worden. Voor de classificatie van deze chimere virussen en inschaling van de voorgenomen werkzaamheden wordt hieronder nader ingegaan op de pathogeniteit en gastheerspecificiteit.

Pathogeniteit van gg-VSIV

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met replicatiecompetente VSIV deeltjes, waarin het gen dat codeert voor de virale glycoproteïne is vervangen door een sequentie die codeert voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of het Marburgvirus. De aanvrager stelt dat de replicatiecompetente gg-VSIV deeltjes geattenuëerd zijn ten opzichte van het wild-type VSIV en bewezen is dat zij niet pathogeen zijn in mensen en dieren.

Ter onderbouwing van zijn mening verwijst de aanvrager onder andere naar een studie van Roberts *et al.*, waarin muizen intranasaal geïnoculeerd zijn met zowel wild-type VSV als recombinant wild-type VSV.⁹ Inoculatie met het wildtype VSV leidt bij deze muizen tot gewichtsafname en sterfte, terwijl inoculatie met een recombinant wild-type VSV een tijdelijk doch aanzienlijk gewichtsverlies tot gevolg heeft. In een andere muizenstudie van Garbutt *et al.* is bij muizen zowel het wild-type VSV als een recombinant VSV met het glycoproteïne van Ebolavirus, Marburgvirus of Lassavirus intraperitoneaal toegediend.¹⁰ In deze studie leidde zowel de toediening van het wild-type VSV als de recombinante virussen onder de geteste condities niet tot gewichtsafname of andere klinische symptomen bij de muizen.

De aanvrager verwijst tevens naar enkele immunologische studies in apen. In een studie van Jones *et al.*¹¹ kregen apen recombinant VSIV met daarin de coderende sequentie voor het glycoproteïne van het Ebolavirus of Marburgvirus toegediend. Na toediening van deze virussen was er lichte viremie te zien, maar traden er geen ziekteverschijnselen op. In de studie van DiCaprio *et al.*¹² kregen apen eerst het Marburgvirus toegediend en vervolgens de bovengenoemde recombinante virussen. Ook in deze studie werd in de apen viremie waargenomen van de betreffende recombinante VSIV vectoren. Door de vaccinatie met het recombinant VSIV dat het glycoproteïne van het Marburgvirus bevatte, werden de apen beschermd tegen de infectie met het Marburgvirus. In een derde studie werden apen gevaccineerd met een gemengd vaccin bestaande uit onder ander bovengenoemde gg-VSIV virusdeeltjes.¹³ Geen van de dieren ontwikkelden ziekteverschijnselen als gevolg van de vaccinaties.

De afwezigheid van pathogeniteit in de mens blijkt volgens de aanvrager uit een publicatie waarbij een laboratoriummedewerker na accidentele blootstelling aan het Ebolavirus werd behandeld met een experimenteel recombinant VSV vaccin dat het glycoproteïne van het Ebolavirus bevat.¹⁴ Na behandeling met dit vaccin kreeg de patiënt kortdurend koorts, maar bleef verder gezond. Aangezien in deze studie niet aangetoond kon worden dat de patiënt daadwerkelijk besmet was met het Ebolavirus, is het onduidelijk of de koorts werd veroorzaakt door het Ebolavirus of het toegediende vaccin.

Op basis van de studie van Garbutt *et al.* waaruit blijkt dat zowel het wild-type VSIV als de recombinante VSIV niet pathogeen is voor de muis, kan de COGEM niet concluderen dat de recombinante VSIVs geattenuëerd zijn. Daarentegen wijst de studie van Roberts *et al.* uit dat een recombinant wild-type VSIV minder pathogeen is dan een wild-type VSIV in muis. De oorzaak

van de waargenomen wijziging in pathogeniteit blijft onverklaard. Tevens is er geen onderzoek gedaan naar de dosis-afhankelijke pathogeniteit. Hoewel uit deze studie niet blijkt in welke mate het recombinant VSIV geattenuëerd is, acht de COGEM het op basis van deze studie aannemelijk dat de recombinante VSIVs in de muis verzwakt zijn.

Volgens de aanvrager laten de studies in apen zien dat de recombinante VSIVs minder pathogeen zijn in deze dieren. De COGEM merkt hierbij echter op dat in geen van deze studies een vergelijking is gemaakt met het wild-type VSIV. De COGEM beaamt dat de recombinante VSIV virussen onder de geteste condities niet of beperkt pathogeen zijn in apen, maar zij kan niet concluderen dat de gebruikte recombinante virussen in apen daadwerkelijk verzwakt zijn ten opzichte van het wild-type VSIV.

De aanvrager baseert de attenuatie van de recombinante virussen in de mens op een gepubliceerde *casestudy* waarbij een persoon is gevaccineerd met een experimenteel recombinant VSV vaccin dat het glycoproteïne van het Ebolavirus bevat. De COGEM is van mening dat zij op basis van één studie waarin slechts één dosis aan één persoon is toegediend, niet kan concluderen dat betreffende recombinant VSIV apathogeen is voor de mens.

Een belangrijk aspect van de classificatie van wild-type VSIV is de pathogeniteit van dit virus voor koeien, paarden en varkens. De COGEM is niet bekend met wetenschappelijk onderzoek waarin de pathogeniteit van de genoemde VSIVs in deze diersoorten is onderzocht. De aanvrager vermeldt dat inoculatie van de recombinante VSIVs geen pathogeniteit laten zien in geiten. De resultaten van deze studie zijn echter (nog) niet gepubliceerd. De COGEM merkt op dat, afhankelijk van de studieopzet en de resultaten van de betreffende studie in geiten de vermoedelijke attenuatie van de gg-VSIV virussen verder zou kunnen onderbouwen. Op basis van de beschikbare literatuur kan de COGEM op dit moment evenwel niet concluderen dat de recombinante VSIV virussen in bovengenoemde diersoorten minder pathogeen zijn dan het wild-type VSIV.

Gastheerbereik en verspreiding

Het tropisme van zowel VSIV als het Ebolavirus en het Marburgvirus worden (mede) bepaald door het glycoproteïne. De aanvrager geeft aan dat het VSIV alle dierlijke cellen kan binnengaan, omdat het, voor zover bekend, niet afhankelijk is van een specifieke eiwitreceptor. Daarentegen zijn het Ebolavirus en Marburgvirus voor hun infectie afhankelijk van meerdere eiwitreceptoren. Hierdoor worden cellen van reptielen of amfibieën bijvoorbeeld niet geïnfecteerd door deze filovirussen. *In vivo* infecteren filovirussen voornamelijk endotheliale-, dendritische en levercellen. De aanvrager concludeert hieruit dat het tropisme van de filovirussen beperkter is dan het tropisme van het VSIV.

Doordat het glycoproteïne van VSIV in het gg-VSIV is vervangen door die van hetzij Ebolavirus of Marburgvirus, is de aanvrager van mening dat het tropisme van gg-VSIV vergelijkbaar zal zijn met dat van respectievelijk het Ebolavirus of het Marburgvirus. En het

tropisme van gg-VSIV dus beperkter is dan dat van het wild-type VSIV. Hij verwacht overigens wel dat de gg-VSIV's in principe alle celtypen in zoogdieren kunnen infecteren.

Wild-type VSIV kan worden overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren of via inhalatie van besmette aerosolen. Mogelijk kan een laboratoriummedewerker na besmetting door bijvoorbeeld aerosolen het gg-VSIV buiten het laboratorium aerogeen verspreiden. In geen van de aangeleverde studies is gekeken naar de mogelijke aerogene verspreiding van het recombinante VSIV. In een studie van Garbutt *et al.* wordt na intraperitoneale toediening van zowel wild-type VSIV als gg-VSIV in muizen geen pathogeniteit waargenomen.¹⁰ Daarentegen blijkt uit de studie van Roberts *et al.* dat recombinant VSIV na intranasale toediening pathogeen is voor muizen, hoewel de pathogeniteit gereduceerd is ten opzichte van het wild-type VSIV.⁹ Dit wijst erop dat de studies waarin recombinant VSIV intraperitoneaal is toegediend niet maatgevend zijn om op dit punt tot een oordeel te komen.

De COGEM deelt de mening van de aanvrager dat de gg-VSIV virussen door het glycoproteïne van hetzij het Ebolavirus, hetzij het Marburgvirus een beperkter tropisme zullen hebben dan het wild-type VSIV. Bovendien leidt de COGEM uit de studie van Garbutt *et al.* af dat de replicatie efficiëntie van gg-VSIV waarin het oorspronkelijk glycoproteïne is vervangen door een glycoproteïne van het *Lake Victoria marburgvirus* of het *Zaire ebolavirus in vitro* afneemt ten opzichte van het wildtype virus.¹⁰

Een belangrijke reden voor inschaling van het VSIV in pathogeniteitsklasse 3 is echter het feit dat het grote schade kan toebrengen aan vee en gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen. Doordat de gg-VSIV vermoedelijk alle celtypen van zoogdieren kan infecteren, en geen informatie beschikbaar is over de mogelijke aerogene verspreiding kan de COGEM op basis van geleverde gegevens niet uitsluiten dat het gg-VSIV koeien, paarden of varkens kan infecteren en zich onder deze dieren kan verspreiden. Derhalve biedt het beperkte tropisme onvoldoende basis een inschaling van het gg-VSIV in pathogeniteitsklasse 2 te rechtvaardigen.

Conclusie

Hoewel de COGEM begrip heeft voor het verzoek van de aanvrager om gg-VSIV in te delen in pathogeniteitsklasse 2, komt de COGEM tot een andere afweging en is zij van mening dat de aangeleverde literatuurgegevens niet overtuigend bewijzen dat de recombinante VSIVs voldoende geattenuëerd zijn ten opzichte van het wild-type VSIV om omlaagschaling van pathogeniteitsklasse 3 naar 2 te rechtvaardigen. De COGEM is vanuit voorzorg daarom van mening dat de werkzaamheden met de replicatiecompetente gg-VSIV deeltjes, conform de classificatie van het VSIV, op ML-III inperkingsniveau uitgevoerd moeten worden. Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de op dit inperkingsniveau geldende werkvoorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
2. Rose JK & Whitt MA (2001). *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In Fields Virology. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1221-1244
3. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. Trends Mol Med. 10: 210-6.
4. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. Vet J. 157: 239-60
5. Public Health Agency of Canada (PHAC). www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/stomatit-eng.php (10 augustus 2011)
6. LCI-richtlijn Virale hemorrhagische koorts: Filovirussen. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. <http://bit.ly/HWPDjX>
7. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
8. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
9. Roberts *et al.* (1998) Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge. J Virol. 72: 4704–4711.
10. Garbutt M *et al.* (2004) Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. J Virol. 2004 78: 5458-65.
11. Jones SM *et al.* (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. Nat Med. 11: 786-90
12. DiCaprio KM *et al.* (2006). Postexposure protection against Marburg haemorrhagic fever with recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates: an efficacy assessment. Lancet. 367: 1399-404.
13. Geisbert TW *et al.* (2009). Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus. J Virol. 83: 7296-304.
14. Gunther S *et al.* (2011). Management of accidental exposure to Ebola virus in the biosafety level 4 laboratory, Hamburg, Germany. J Infect Dis. 3: S785-90.