

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 03 september 2014
KENMERK CGM/140903-03
ONDERWERP Advies Inschaling van *in vivo* werkzaamheden met gg-rabiesvirusvaccin

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag IG 14-024 met als titel "Ontwikkeling van een vaccin tegen Rabiësvirus" van Intervet International deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van *in vivo* werkzaamheden met het gg-rabiësvirusvaccin, ORA-DPC. De aanvrager wil voor de ontwikkeling van een rabiësvirusvaccin muizen vaccineren met ORA-DPC en de beschermende werking van dit vaccin testen door de muizen na vaccinatie bloot te stellen aan het *wildtype* rabiësvirus (RABV). De aanvrager verzoekt hierbij de open handelingen buiten een veiligheidskabinet klasse II uit te mogen voeren.

Het RABV wordt hoofdzakelijk overgebracht door een beet, lik of krab van een besmet dier. Een beet van een besmette hond is voor de mens de belangrijkste oorzaak van een besmetting met het RABV. In zoogdieren veroorzaakt RABV een ernstige ziekte. De enige vorm van behandeling is toediening van een RABV-specifiek vaccin of antilichamen direct na een mogelijke besmetting. Als de ziekte zich eenmaal openbaart, is geen adequate behandeling meer mogelijk en leidt RABV in de meeste gevallen tot de dood.

De COGEM adviseert de voorgenomen vaccinatie-experimenten met ORA-DPC en *wildtype* RABV op DM-III inperkingsniveau in te schalen. Gezien de mogelijke transmissieroutes van RABV en het feit dat de aanvrager de open handelingen buiten een veiligheidskabinet klasse II wil uitvoeren, adviseert de COGEM een aantal aanvullende voorschriften te hanteren om het risico van besmetting van en uitsleep door de medewerker te minimaliseren. Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen *in vivo* werkzaamheden met het gg-rabiësvirusvaccin voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

Inschaling van *in vivo* werkzaamheden met gg-rabiësvirusvaccin

COGEM advies CGM/140903-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de vergunningaanvraag IG 14-024 getiteld “Ontwikkeling van een vaccin tegen Rabiesvirus” van Intervet International. Voor de ontwikkeling van een rabiësvirusvaccin is de aanvrager van plan genetische gemodificeerde rabiësvirusdeeltjes te produceren en deze te testen in muizen. Als onderdeel van de *in vivo* experimenten wil de aanvrager de muizen, na vaccinatie met het gg- rabiësvirus ‘challengen’ met wildtype *Rabies virus*. De adviesvraag aan de COGEM is beperkt tot de inschaling van de challenge experimenten in muizen.

2. Kenmerken van het *Rabies virus*

Pathogeniteit en transmissie

Het *Rabies virus* (RABV) behoort tot het genus *Lyssavirus* binnen de familie van de *Rhabdoviridae*.¹ Een infectie met het RABV leidt in mensen en zoogdieren tot een ernstige ziekte, die rabiës of in de volksmond ook wel hondsdolheid wordt genoemd. Transmissie van het RABV vindt in het algemeen plaats door contact met besmet speeksel na een beet of krab van een besmet dier. Er is in de wetenschappelijke literatuur ook enkele malen gerapporteerd dat het RABV is overgedragen als gevolg van een transplantatie of in geval van laboratoriumwerkzaamheden via aerosolen.^{2,3} Over het algemeen openbaren de eerste symptomen van ziekte zich na een incubatieperiode van gemiddeld een à twee maanden, maar afhankelijk van de plaats van de beet kan dit variëren.

Het RABV is neurotroop. Hoewel besmetting meestal optreedt in niet-neuronaal weefsel, kan het virus zich hier wel vermenigvuldigen. Na deze eerste ronde van replicatie verspreidt het zich naar de neuronen en naar de hersenen, hetgeen leidt tot hersenontsteking. In het begin van de ziekte treden over het algemeen weinig specifieke symptomen op als koorts, verminderde eetlust, misselijkheid, braken en hoofdpijn. Later treden zenuwverschijnselen op als krampen, verlammingen, nekstijfheid, hyperactiviteit en stuipen. In het finale stadium treedt coma op leidend tot de dood.

Geologische verspreiding

Rabiës kwam al voor in de klassieke oudheid en werd voor het eerst beschreven in de Codex van Eshnunna ca. 2200 v. C.⁴ Het klassieke rabiësvirus komt wereldwijd voor met uitzondering van Antarctica, grote delen van Oceanië en Japan.⁵ Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) overlijden er ieder jaar meer dan 60.000 mensen aan de gevolgen van een infectie met het RABV.⁶ De prevalentie van een RABV-infectie is het hoogst in Azië en Afrika. Een beet van een besmette hond is voor de mens de belangrijkste oorzaak van een besmetting met RABV. Er wordt algemeen aangenomen dat het RABV van nature niet van mens op mens overgedragen wordt.⁷

Aanvankelijk was het RABV ook aanwezig in West- en Centraal Europa. Door orale vaccinatieprogramma's waarin lokaas met vaccin uitgelegd werd voor onder andere vossen, is rabiës in deze delen van Europa sterk afgenomen. Sinds de vaccinatiecampagne in 1988 tijdens de laatste uitbraak van rabiës onder dieren komt het klassieke RABV in Nederland niet meer voor bij vossen en huisdieren.⁸ In Nederland kunnen bepaalde soorten vleermuizen (de laatvlieger en de meervleermuis) rabiës nog wel bij zich dragen.

Tot de ontwikkeling van een vaccin door Louis Pasteur in 1885 was een besmetting met het RABV voor mensen altijd fataal. Door toediening van een vaccin of immunoglobulinen voor of direct na een mogelijke besmetting met het virus, kan het virus effectief geneutraliseerd worden en wordt de ziekte voorkomen. Echter op het moment dat de eerste klinische symptomen zich openbaren, is er geen adequate behandeling mogelijk. In deze fase leidt een infectie met RABV vrijwel altijd tot het overlijden van de getroffen. Er zijn slechts enkele gevallen bekend waarin mensen met rabiës-symptomen de ziekte hebben overleefd.⁹ De WHO meldt dat wereldwijd jaarlijks ongeveer 29 miljoen mensen profylaxe krijgen toegediend.⁶

Opbouw van het virusdeeltje

Het RABV heeft een lineair, negatief-strengs RNA genoom van ongeveer 12 kb. Het virusgenoom 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).¹⁰ Het genoom wordt ingepakt in een kogelvormig virusdeeltje dat ongeveer 180 nm lang en 75 nm breed is.¹⁰ Dit deeltje bestaat uit een spiraalvormige, zogenaamde 'nucleoproteïne' kern die wordt omgeven door een lipidemembraan. De kern wordt gevormd door het N-eiwit, het P-eiwit en het L-eiwit. Het genomische RNA bevindt zich in de kern. Het RNA polymerase (L-eiwit) in de 'nucleoproteïne' kern is betrokken bij de transcriptie en de replicatie van het virale genoom.

Het G-eiwit vormt ongeveer 400 trimere 'spikes', die verankerd zijn in het membraan en geëxposeerd aan de oppervlakte van het virus. Het G-eiwit zorgt voor de binding van het virus aan en infectie van de gastheercellen, en speelt een belangrijke rol in de pathogeniteit van het virus. Na infectie met RABV treedt er een afweerreactie op, die met name gericht is tegen het G-eiwit. Het M-eiwit bindt aan de 'nucleoproteïne' kern en het cytoplasmatische domein van het G-eiwit. Het M-eiwit speelt een centrale rol in de assemblage van het uiteindelijke virusdeeltje en faciliteert het zogenaamde 'buddingproces' waardoor het virus uit de cel vrijkomt.^{1,10}

3. Het gg-rabiësvirusvaccin ORA-DPC

Voor de vaccinatie van de muizen wil de aanvrager gebruik maken van ORA-DPC. Dit is een afgeleide van de vaccinstam SAD-B19, die in Europa uitgebreid is gebruikt voor de vaccinatie van vossen.¹¹ Er zijn in de vaccinstam SAD-B19 drie mutaties aangebracht om ORA-DPC te creëren. De eerste mutatie betreft de verandering van de coderende sequentie voor het G-eiwit, waardoor de arginine op positie 333 vervangen is door een asparaginezuur.¹² Door deze verandering wordt de toegang van het virus tot de neuronen geremd. De tweede mutatie betreft de deletie van de aminozuren 143 tot en met 149 uit het P-eiwit.¹² Dit deel is essentieel voor transport van het virus

in de neuronen. De laatste mutatie wordt gevormd door de introductie van een tweede G-eiwit coderende sequentie met dezelfde aminozuurverandering als beschreven bij de eerste mutatie.

4. Eerder COGEM advies

In 2002 heeft de COGEM RABV in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld.¹³ In de betreffende vergunningaanvraag werd voor de werkzaamheden gebruik gemaakt van gg-rabiësvirussen, die afgeleid waren van de vaccinstam SAD B19. Deze vaccinstam is ook in onderhavige aanvraag de uitgangsstam bij de ontwikkeling van het te testen vaccin, ORA-DPC. In haar advies uit 2002 beschouwde de COGEM de vaccinstam SAD B19 als een klasse 2 pathogeen. Mede gebaseerd op deze classificatie adviseerde zij de *in vivo* handelingen met de gg-rabiesvirussen op DM-II inperkingsniveau in te schalen. Tevens adviseerde zij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- De dieren moeten gehuisvest worden in filtertopkooien,
- De kooien dienen in een klasse II veiligheidskabinet geopend te worden en dienen uitwendig ontsmet te worden, voordat ze uit het veiligheidskabinet verwijderd worden,
- Tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen.

In 2010 heeft de COGEM de classificatie van RABV opnieuw tegen het licht gehouden.¹⁴ Zij adviseerde om RABV in pathogeniteitsklasse 3 in te blijven delen. In deze vergunningaanvraag werd o.a. gebruik gemaakt van vol virulent gg-RABV en chimere gg-RABV vectoren met maximaal één gen van hetzij het *Mokola virus* hetzij het *Duvenhage virus*. De voorgenomen werkzaamheden met proefdieren in associatie met beoogde gg-RABV vectoren heeft de COGEM geadviseerd op DM-III inperkingsniveau uit te voeren. Om de mogelijke risico's voor met name de medewerker te minimaliseren, achtte zij het van belang dat de volgende aanvullende voorschriften werden gehanteerd:

- Betreffende dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen;
- Alle medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen lyssavirus.

5. Voorgenomen werkzaamheden

Om het beschermende effect van een vaccinatie met ORA-DPC te testen, wil de aanvrager muizen na vaccinatie challengen met *wildtype* RABV. In dit challenge experiment worden de muizen eerst oraal gevaccineerd met ORA-DPC. Minimaal 14 dagen na de vaccinatie zal het *wildtype* RABV intracerebraal toegediend worden. De aanvrager heeft in de DM-III faciliteit geen beschikking over een veiligheidskabinet klasse II. Ter bescherming van de medewerker en het milieu stelt de aanvrager de volgende aanvullende maatregelen voor om het ontbreken van een veiligheidskabinet klasse II te compenseren:

- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen lyssavirus en hebben voldoende antistoftiter;

- Medewerkers dragen een Tyvac overall en een haarnetje, die na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte worden achtergelaten;
- Medewerkers dragen apart schoeisel. Dit schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- Het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding is verplicht;
- Het dragen van een mond- en neuskapje (FFP3) en een gelaatscherm is verplicht;
- Bij het verlaten van de ruimte is de medewerker verplicht te douchen.

De aanvrager stelt dat dit regime zal gelden voor iedereen, die de dierruimte betreedt.

De dieren worden gehuisvest in een filtertopkooi en na de challenge gedurende de infectieuze periode van 14 dagen niet verschoond. De gechallengeerde muizen zullen alleen beoordeeld worden op vitaliteit. Er zullen geen weefsels, cellen of bloed van deze dieren worden afgenomen voor verder onderzoek. Na afloop van het experiment worden de dieren met behulp van CO₂ geëuthanaseerd.

6. Overweging

Pathogeniteit

Het gg-rabiësvirus vaccin, ORA-DPC dat de aanvrager wil onderzoeken is gebaseerd op de vaccinstam SAD-B19. In een veldproef in vossen uit 1983 is deze vaccinstam zowel veilig als effectief gebleken. Het uitgebreid inzetten van dit vaccin heeft in Europa geleid tot een drastische vermindering van rabiësgevallen en heeft in sommige delen van Europa zelfs geresulteerd tot de eradicatie van rabiës in het vossenbestand.¹⁵ In 2002 heeft de COGEM deze vaccinstam in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.

Om het ORA-DPC te verkrijgen zijn drie mutaties aangebracht in SAD-B19. Het betreft de verandering van een arginine in een asparaginezuur in het G-eiwit, de deletie van een essentieel deel van het P-eiwit en de toevoeging van een extra kopie van de coderende sequentie voor het G-eiwit met eerder genoemde aminozuurverandering. Zoals blijkt uit een studie van Mebatsion resulteren de eerste twee mutaties in een verdere attenuatie van de residuele pathogeniteit van de oorspronkelijke vaccinstam.¹² Terwijl de SAD-B19 vaccinstam pathogeen is voor volwassen muizen blijkt de variant met genoemde twee mutaties apathogeen te zijn. Ook in hele jonge muizen werd een attenuatie van de pathogeniteit ten gevolge van deze mutaties waargenomen.

De laatste mutatie betreft de insertie van een extra kopie van het gemuteerde G-eiwit. In de aanvraag wordt niet toegelicht wat het effect is van deze toevoeging op de pathogeniteit. Aangezien deze toevoeging de vaccinstam geen nieuw functionaliteit biedt, is de COGEM van mening dat de toename van de genomelengte ten gevolge van deze toevoeging hoogst waarschijnlijk zal leiden tot een reductie van de replicatie-efficiëntie. Concluderend is zij van mening dat de te gebruiken vaccinstam ORA-DPC ten opzichte van de uitgangstam SAD-B19 nog verder geattenuëerd zal zijn. Zij deelt deze vaccinstam in pathogeniteitsklasse 2 in.

Gelet op de huidige stand van de wetenschappelijke kennis ziet de COGEM geen reden om de classificatie van het *wildtype* RABV, zoals toegelicht in haar advies uit 2010 te herzien.¹⁴ Zij beschouwt het RABV als een pathogeen van klasse 3.

Transmissie

Van nature vindt transmissie van RABV naar een mens plaats door contact met besmet speeksel ten gevolge van een beet of krab van een besmet dier. Er is in de wetenschappelijke literatuur enkele malen gerapporteerd dat RABV mogelijk via aerosolen is overgedragen als gevolg van laboratoriumwerkzaamheden met RABV, of RABV besmet materiaal.^{16,17} De aanvrager geeft aan dat er in een aantal gevallen niet onomstotelijk bewezen is dat de betreffende mensen via aerosolen met het RABV zijn besmet. De COGEM beaamt dit, maar wijst er op dat deze transmissie route in deze gevallen ook niet uitgesloten kan worden. Bovendien blijkt uit een studie van Johnson *et al.*, waarin muizen werden blootgesteld aan aerosolen met RABV, dat RABV op dosis-afhankelijke wijze via de lucht overdraagbaar is.¹⁷ Dat deze transmissieroute ook in mensen kan leiden tot infectie met RABV wordt ondersteund door een casus uit 1977 waarin een medewerker accidenteel werd blootgesteld aan een spray met gemodificeerd levend RABV en dientengevolge met RABV werd geïnfecteerd. Gezien bovenstaande gegevens acht de COGEM het van belang dat bij laboratoriumwerkzaamheden met RABV niet alleen maatregelen moeten worden genomen om infectie te voorkomen ten gevolge van snij- en/of prikincidenten of wondjes in de huid, maar ook ten gevolge van handelingen waarbij aerosolen zouden kunnen ontstaan. Met het oog op het feit dat de aanvrager voornemens is om open handelingen buiten een veiligheidskabinet klasse II uit te voeren, wijst de COGEM ten aanzien van dit laatste aspect tevens op de mogelijkheid dat aerosolen op kleding of in het haar van medewerkers terecht komt en op deze wijze uitgeslept kunnen worden.

Recombinatie tussen gg-rabiësvirus en wildtype RABV

In theorie, kan tussen ORA-DPC en *wildtype* RABV homologe recombinatie optreden. Hierdoor kunnen hoofdzakelijk attenuerende mutaties uit de vaccinstam in het wildtype RABV terecht komen of attenuatie opheffende wildtype domeinen in de vaccinstam. Slechts in één situatie zou door homologe recombinatie het wildtype RABV uitgebreid kunnen worden met een extra kopie van de coderende sequentie voor het G-eiwit. Deze sequentie bevat echter een mutatie die leidt tot een aminozuur verandering in het G-eiwit, waardoor de toegang van het RABV tot neuronen afneemt. Tevens neemt de totale genomelengte door deze insertie toe. De COGEM is van mening dat de replicatie-efficiëntie van het gg-RABV hierdoor zal afnemen. De COGEM acht de kans derhalve verwaarloosbaar klein dat door homologe recombinatie een recombinant ontstaat die pathogener is dan het *wildtype* RABV.

De COGEM wijst er op dat de kans op recombinatie bij veel negatief-strengige RNA virussen zeer klein is. In de wetenschappelijke literatuur zijn weliswaar een aantal mutaties in negatief-strengs RNA virussen toegeschreven aan homologe recombinatie gebeurtenissen, maar dat is niet onomstreden.¹⁸ In het geval van RABV is in de wetenschappelijke literatuur slechts tweemaal een mogelijke recombinatie beschreven.¹⁹ In een studie van Geue *et al.* is het ontstaan van de Europese tak van de SAD rabiësvirussen toegeschreven aan een recombinatie-gebeurtenis. Dit is tot op heden echter niet bevestigd. Ook een fylogenetische analyse van 44 gepubliceerde rabiësvirus genomesequenties door Liu *et al.* heeft slechts drie mogelijke homologe recombinatie aan het licht gebracht die gedurende de evolutie van RABV plaatsgevonden zou kunnen hebben.²⁰

De aanvrager geeft aan dat de challenge minimaal 14 dagen na de vaccinatie zal plaatsvinden. Tevens wordt de vaccinatie met ORA-DPC oraal gegeven, terwijl de challenge met het *wildtype* RABV intercerebraal toegediend zal worden. De COGEM is van mening dat dit de kans op recombinitie tussen ggo en wildtype nog verder zal verkleinen.

Gebaseerd op deze gegevens acht de COGEM de kans zeer klein dat recombinitie tussen ORA-DPC en *wildtype* RABV gedurende de voorgenomen challenge experimenten op zal treden. Zij kan het dit echter niet geheel uitsluiten. De kans dat in voorgenomen challenge experimenten door recombinitie een gg-rabiësvirus ontstaat dat pathogener is dan het *wildtype* RABV acht de COGEM evenwel verwaarloosbaar klein.

7. Advies

Gebaseerd op de pathogeniteit van *wildtype* RABV en de combinatie van dit RABV met gg-rabiesvirus in voorgenomen challenge experimenten adviseert de COGEM deze experimenten op DM-III inperkingsniveau in te schalen.

Gezien de mogelijke transmissie routes van RABV, de mogelijk hoge concentratie waarmee gewerkt wordt, de aard van de handelingen die de aanvrager wil uitvoeren en het feit dat de aanvrager op dit inperkingsniveau niet beschikt over een veiligheidskabinet klasse II adviseert de COGEM daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Alle medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen RABV en moeten minimaal elke 6 maanden gecontroleerd worden op de aanwezigheid van een beschermende rabiësvirus antilichaamtiter;
- Alle medewerkers dragen volledig beschermende werkkleding inclusief handschoenen tot over de mouw van de werkkleding. De werkkleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- Het dragen van een goedpassend mond- en neuskapje (FFP3) en een veiligheidsbril of gelaatscherm is verplicht;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen;
- Betreffende dieren worden gehuisvest in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Bij dit laatste voorschrift merkt de COGEM op dat in de ruimte die de aanvrager wil gebruiken voor huisvesting van de dieren onderdruk heerst en de luchttoevoer en afvoer van deze ruimte HEPA-gefilterd wordt. De aanvrager heeft daarbij aangegeven dat de ruimte alleen gebruikt zal worden voor aangevraagde challenge experimenten en er geen andere dieren aanwezig zullen zijn. De COGEM is van mening dat de DM-III ruimte onder deze voorwaarden in principe als alternatief kan dienen voor bovengenoemde onderdrukisolator. Uit onderhavige aanvraag wordt evenwel niet duidelijk op welke wijze de aanvrager deze ruimte na afloop van voorgenomen experiment zal desinfecteren. Als de aanvrager aantoont dat de ruimte en HEPA-filters op gecontroleerde en gevalideerde wijze gedesinfecteerd kunnen worden, is de COGEM van mening dat onder navolging van bovengenoemde

voorschriften deze ruimte in dit geval in zijn geheel als onderdrukisolator gezien kan worden. Daarbij adviseert zij de dieren in deze ruimte te huisvesten in filtertopkooien.

Indien de ruimte op gecontroleerde en gevalideerde wijze gedesinfecteerd kan worden, kan de COGEM ook instemmen met de voorgestelde vervanging van voorschrift 4.1.7.3.2.w en 4.1.7.3.2.x inzake de opslag en desinfectie van het biologische afval en materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen.

Tevens kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Medewerkers dragen apart schoeisel. Dit schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten;
- Bij het verlaten van de ruimte is de medewerker verplicht te douchen.

Onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van voorgenomen challenge experimenten op DM-III inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

8. Referenties

1. Tordo N *et al.* (2005). *Family Rhabdoviridae*. In: Virus Taxonomy, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by Fauquet CM. *et al.* Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 623-644
2. Johnson N *et al.* (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *J. Med. Microbiol.* 55:785-790
3. Dietzschold B & Koprowski H (2004). Rabies transmission from organ transplants in the USA. *Lancet* 364: 648-649
4. Adamson PB (1977). The spread of rabies into Europe and the probable origin of this disease in antiquity. *J.R. Asiat. Soc. GB Irel.* 2:140-144
5. RIVM (2014). Veelgestelde vragen Rabies. Website: http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Veelgestelde_vragen/Infectieziekten/Veelgestelde_vragen_Rabies (laatst bezocht : 1 september 2014).
6. WHO (2014). Rabies. Website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/> (laatst bezocht: 1 september 2014)
7. Helmick CG *et al.* (1987). Is there a risk to contacts of patients with rabies? *Rev. Infect. Dis* 9:511-518
8. RIVM. Verspreiding en frequentie. Website: http://www.rivm.nl/Onderwerpen/R/Rabies/Verspreiding_en_frequentie (laatst bezocht: 1 september 2014)
9. Wilde H *et al.* (2008). Viewpoint: management of human rabies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102:979-982

10. Mattos de CM *et al.* (2001). Rhabdoviruses. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1245-1277
11. Conzelmann K *et al.* (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated Rabies virus SAD B19. *Vir.* 175:485-499
12. Mebatsion T (2001). Extensive attenuation of Rabies virus by simultaneously modifying the Dynein lighth chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. *J. Vir.* 75:11496-11502
13. COGEM (2002). Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken. (CGM/020318-06)
14. COGEM (2010). Classificatie van drie lyssavirussen. (CGM/101109-03)
15. Schneider LG *et al.* (1988). Current oral rabies vaccination in Europe: an interim balance. *Rev. Infect. Dis. Suppl.* 4: S654-9
16. Gibbons RV (2002). Cryptogenic Rabies, Bats, and the question of aerosol transmission. *Ann. Emerg. Med.* 39:528-536
17. Johnson N *et al.* (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *J. Med. Microbiol.* 55:785-790
18. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3:1358-1373
19. Geue L *et al.* (2008). Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine* 26:3227-3235
20. Liu W *et al.* Evidence for inter- and intra-clade recombination in rabies virus. *Infect. Genet. Evol.* 11:1906-1912