



*Commissie Genetische Modificatie*

**Cogem**  
**postbus 578**  
**3720 AN Bilthoven**

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening  
en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk  
IG 03-012/07.co1

Uw brief van  
1 maart 2006

Kenmerk  
CGM/060314-01

Datum  
14 maart 2006

Onderwerp  
Advies IG 03-012/7

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de aanvraag tot wijziging van vergunning IG 03-012/07, getiteld 'Combinatie vaccins voor HIV-1', van Stichting Biomedical Primate Research Centre en het voorstel tot inschaling dat door het Bureau GGO is opgesteld, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met genetisch gemodificeerde chimere (VEE/SIN) alphavirusvectoren waarin genen van HIV en SIV zijn gekloneerd. De aanvrager is van plan rhesusapen te vaccineren met deze VEE/SIN vectorvirusdeeltjes teneinde te onderzoeken of het mogelijk is een vaccin te ontwikkelen. De aanvrager verzoekt omlaagschaling van de werkzaamheden van DM-III naar DM-II niveau.

De virale VEE/SIN vector die in de experimenten gebruikt wordt bevat geen structurele genen. Dit betekent dat na infectie geen virusdeeltjes gevormd kunnen worden en de virusvector zich niet verder kan verspreiden uit de initiële geïnfecteerde cel. De Amerikaanse producent voert een test uit om er zeker van te zijn dat er bij de productie door ongewenste recombinaties geen volvirulent virus ontstaat. De COGEM is van mening dat deze test voldoende zekerheid biedt om de aanwezigheid van volvirulent virus uit te sluiten. De COGEM adviseert de rhesusapen te testen op de aanwezigheid van verwante alphavirussen. Dit om een eventueel risico van recombinatie uit te sluiten.

Het bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft als de werkzaamheden in een DM-II dierverblijf uitgevoerd worden. Gezien de aard van de virale vector ziet de COGEM uit het oogpunt van veiligheid geen noodzaak om additionele maatregelen gericht tegen verspreiding door de lucht - zoals het dragen van mondkapjes door de laboratoriummedewerkers - op te leggen.

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 large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. R.C. Zwart

# Vaccinatie van apen met recombinante chimere alphavirusvectoren ten behoeve van vaccinonderzoek

COGEM advies: CGM/060314-01

## Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met genetisch gemodificeerde chimere alphavirussen. Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen en testen van een vaccin tegen het AIDS virus. Het vaccin bestaat uit delen van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en *Sindbis virus* (SINV) waarin genen gekloneerd zijn die coderen voor eiwitten van het humane of apen immunodeficiëntie virus (HIV en SIV). Het vaccin zal getest worden in rhesusapen.

## Alphavirussen

SINV en VEEV behoren beide tot het genus *Alphavirus* binnen de familie *Togaviridae* (1). Alphavirussen behoren tot de zogenaamde arbovirussen (arthropod borne viruses) die voor hun verspreiding afhankelijk zijn van insecten, in dit geval muggen. De alphavirussen kunnen op basis van de symptomen die ze veroorzaken worden verdeeld in twee groepen: virussen die ziekten zoals huiduitslag en artritis veroorzaken, en virussen die tot encefalitis (hersenontsteking) kunnen leiden. De laatste groep van virussen komt voornamelijk voor op het Amerikaanse continent. De andere virussen komen hoofdzakelijk voor in Europa, Azië en Afrika (2).

De infectiecyclus van alphavirussen speelt zich hoofdzakelijk af tussen knaagdieren, muggen en vogels. Grotere dieren, zoals paarden, en mensen kunnen geïnfecteerd raken maar zijn zogenaamde 'dead end hosts' en spelen geen rol bij de infectiecyclus (2).

Alphavirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 12.000 nucleotiden. De niet structurele eiwitten worden gecodeerd op het 5'-einde van het genoom terwijl de structurele eiwitgenen op het 3'-einde liggen (1).

De virusdeeltjes zijn bolvormig (icosahedrisch) met een diameter van 60 tot 70 nm. Het RNA is ingekapseld in een eiwitmantel. Dit nucleocapside is omgeven door een lipidemembraan. Het membraan bevat twee glycoproteïnes (E1 en E2) die naar buiten uitsteken. De glycoproteïnes zijn betrokken bij aanhechting en infectie van de gastheercel en spelen derhalve een rol bij het gastheerbereik (1, 2).

Er zijn in totaal 25 verschillende alphavirussen bekend die verschillende diersoorten kunnen infecteren (1, 3). De alphavirussen worden op basis van homologieën tussen de aminozuursequenties van de E1 eiwitten verdeeld in verschillende subgroepen. (1). VEEV behoort tot het zogenaamde VEE-complex, terwijl SINV behoort tot het WEE-

complex. Ook zijn de symptomen die beide virussen veroorzaken verschillend en hebben ze een andere geografische verspreiding.

#### *VEEV*

VEEV komt endemisch voor in de tropische en subtropische regio's van Centraal- en Zuid-Amerika, Mexico en Florida waar het paarden, ezels, muil dieren en mensen infecteert (2). Infectie met VEEV kan leiden tot encefalitis bij zowel mensen als dieren. Het virus is zeer infectieus, maar de letaliteit is voor volwassenen minder dan 10% en voor jonge kinderen tussen de 20 en 30%. De meeste patiënten herstellen binnen twee weken. Na een infectie treedt een zeer goede immuniteit op. Tegen het virus bestaan enkele levende geattenuerde vaccins, maar deze zijn niet erg effectief (2).

Het virus wordt hoofdzakelijk door de muggensoort *Culex melanoconion* spp. verspreid. Echter, er zijn een aantal gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aëroge verspreiding heeft plaatsgevonden (2). Het is onduidelijk in hoeverre dit onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt. Het virus noch zijn muggenvector komt in Nederland voor. VEEV is ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 3 (4).

#### *SINV*

SINV is een van de meest wijdverspreide alphavirussen en komt onder meer voor in Afrika, Azië, Australië, Midden-Oosten, Oost-Europa, Scandinavië en Rusland (13). SINV heeft een brede gastheerreeks waaronder vogels en knaagdieren. Vogels worden verondersteld het belangrijkste reservoir voor infectie te vormen. Trekvogels lijken een belangrijke rol te spelen bij de verspreiding van het virus (13). Geïnfecteerde muggen (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex* en *Culiseta* spp.) kunnen het virus van vogels op de mens overbrengen. De symptomen die het virus veroorzaakt zijn over het algemeen mild waaronder plotseling opkomende koorts, huiduitslag, artritis, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn. SINV is vrij stabiel en kan tot twee dagen in bloed buiten het lichaam infectieus blijven (2).

Het virus wordt beschouwd als één van de minst gevaarlijke alphavirussen voor de mens en wordt daardoor vaak gebruikt als een modelsysteem in wetenschappelijk onderzoek (3, 5, 6). Het SINV is ingedeeld als een virus van pathogeniteitsklasse 2 (4).

#### *Recombinant alphavirus vaccin*

De recombinante VEE/SIN alphavirus expressievector waarmee de experimenten uitgevoerd zullen worden, zal geproduceerd worden in de Verenigde Staten door Chiron Corporation. Met behulp van deze vector zullen HIV en SIV eiwitten tot expressie gebracht worden in rhesusapen. Het VEE/SIN expressieconstruct of replicon bevat de niet-structurele VEEV genen (nsP1-4) die coderen voor het

replicase en de 5' in cis gelegen sequenties die nodig zijn voor de replicatie (7). Het 3' uiteinde van het construct en het packaging-signaal (noodzakelijk voor het inpakken van het RNA in virusdeeltjes) zijn afkomstig van het SINV. Het construct mist structurele eiwitgenen. De structurele eiwitten zijn noodzakelijk voor de verdere verspreiding van het virus van cel naar cel. Deletie van de structurele genen maakt dat geen nieuwe virusdeeltjes gevormd kunnen worden en dat het virus beperkt blijft tot de geïnfecteerde cel en verdere verspreiding onmogelijk is. Hiermee is de vector feitelijk replicatiedeficiënt.

Infectieuze vectordeeltjes worden geproduceerd door BHK-21 cellen te co-transfecteren met het replicon RNA en twee helper RNA's. Deze helper RNA's bevatten de 5' en 3' in cis gelegen uiteinden van VEEV en coderen voor respectievelijk de E2/E1 glycoproteïnen en het capside eiwit van SINV (7). De helper RNA's zijn gedeleteerd voor de niet-structurele eiwitten van VEEV en bevatten geen packaging signaal. Doordat alleen het VEE/SIN replicon kan amplificeren en de helper RNA's de geschikte inpaksignalen missen zullen na co-infectie recombinant replicatie-defectieve alphavirus deeltjes ontstaan waarbij een chimeer VEE/SIN RNA ingepakt is in eiwitten geheel afkomstig van SINV.

De producent controleert de vectorbatch standaard op de afwezigheid van replicatiecompetent virus (RCV).

### **Eerder COGEM advies**

In een eerder advies (CGM/04212-02) heeft de COGEM reeds over identieke VEE/SINV vectoren geadviseerd. Destijds heeft de COGEM positief geadviseerd over omlaagschaling van ML-III naar ML-II. In haar advies stelde de COGEM dat de kans op het ontstaan van RCV bij de productie van deze VEE/SIN vectoren uiterst gering is. Op basis hiervan, de aard van de werkzaamheden en het feit dat de toegevoegde waarde van een ML-III t.o.v. een ML-II ruimte voornamelijk gericht is op het voorkomen van verspreiding buiten de ruimte - en niet zo zeer op persoonlijke veiligheid - heeft de COGEM positief geadviseerd.

### **Adviesvraag**

De aanvrager is van plan vaccinstudies uit te voeren door rhesusapen te injecteren met VEE/SIN vectoren waarop HIV en SIV genen tot expressie worden gebracht. Naast het VEE/SIV construct zullen ook andere (eerder vergunde) expressieconstructen, met HIV en SIV genen, in combinatie worden geïnjecteerd (waaronder adenovirale vectoren, plasmide met de SV40 'origin of replication' (ori) en genetisch gemodificeerde pokkenvirussen). Na de vaccinatie zal regelmatig bloed worden genomen om de immunrespons te bepalen. Uiteindelijk zullen de apen geïnfecteerd worden met een chimeer SIV/HIV (SHIV) teneinde de effectiviteit van de immunrespons te bepalen. Aan het einde van de studie zullen de apen geëuthanaseerd worden

Bij werkzaamheden met chimere virussen, zoals de vaccinatie van rhesusapen, worden de werkzaamheden ingeschaald volgens het principe dat indeling plaats vindt naar de hoogste inschaling van de 'oudervirussen'. VEEV is een klasse 3 pathogeen. Een chimeer alphavirus opgebouwd uit delen van het SINV en VEEV wordt derhalve als pathogeniteitsklasse 3 geclassificeerd. Handelingen met een dergelijk chimeer virus moeten dientengevolge op een ML-III of DM-III niveau plaatsvinden. Indien echter het recombinant virus zich niet kan repliceren en verspreiden (replicatiedeficiënt) kan inschaling op een lager niveau plaatsvinden. In haar eerdere advies heeft de COGEM gesteld dat laboratoriumwerkzaamheden met VEE/SIN vectoren op ML-II kunnen plaatsvinden.

De COGEM is gevraagd of zij ermee kan instemmen dat de experimenten, waarbij de apen geïnfecteerd worden met de VEE/SIN expressievector, onder DM-II omstandigheden kunnen plaatsvinden. Inschaling op DM-II niveau zou volgen uit haar eerdere advies om laboratoriumexperimenten met deze vectoren onder ML-II te laten plaatsvinden. Gedurende en na de 'challenge' met SHIV zullen de dieren overigens gehuisvest worden op DM-III niveau. Experimenten met apen waar ook gebruik gemaakt wordt van adenovirale vectoren zullen op DM-III plaatsvinden vanwege het risico van eventuele aërogene verspreiding van de adenovirale vector.

Verder wordt de COGEM gevraagd of er redenen zijn om te veronderstellen dat er aërogene verspreiding van de VEE/SIN vectoren kan plaatsvinden. Dit zou een reden zijn om aanvullende maatregelen op te leggen zoals het dragen van een mondkapje. Daarnaast wordt de COGEM gevraagd of zij het noodzakelijk acht om de apen te testen op de aanwezigheid van wildtype SINV, VEEV of andere alphavirussen, in het verband met een eventueel risico op recombinatie tussen het geïnjecteerde construct en wildtype virussen.

### **Overweging en advies**

Een mogelijk risico bij werkzaamheden met virale vectoren is dat bij de productie replicatiecompetent virus (RCV) gevormd wordt dat zich verder kan verspreiden in het milieu of laboratoriummedewerkers kan infecteren. Daarnaast is er het eventuele risico dat de laboratoriummedewerker geïnfecteerd wordt met de virale vector doordat de medewerker blootgesteld wordt aan virale vectordeeltjes.

Bij de voorgestelde werkzaamheden zal gebruik gemaakt worden van een VEE/SIN vector die een cel kan binnendringen en infecteren maar niet in staat is om nieuwe deeltjes te vormen en zich verder te verspreiden. Bij de productie van de vector wordt gebruik gemaakt van drie verschillende constructen, het VEE/SIN replicon en twee helper RNA's (7). Aangezien de homologie tussen het replicon en de helper RNA's tot een minimum beperkt is en de structurele eiwitten door twee aparte RNA's worden

gecodeerd, is de kans op recombinatie waarbij RCV zou kunnen ontstaan uiterst gering. De kans op het optreden van recombinatie is afhankelijk van de mate van sequentie-overeenkomst en daarnaast zijn er twee onafhankelijk 'recombinatie-gebeurtenissen' nodig.

De producent (Chirion) test op aanwezigheid van RCV door middel van vijf passages op BHK-21 cellen. De celkweken worden gecontroleerd op cytopathogene effecten. Infectie van BHK-21 cellen met alphavirussen leidt tot sterke cytopathogene effecten zoals vervorming en krimpen van de cel en de vorming van blaasjes in het cytoplasma, gevolgd door celdood binnen 24 uur (2). Tevens wordt het supernatant van elke passage toegevoegd aan een reportercelijn die  $\beta$ -galactosidase tot expressie brengt als de non-structurele genen van het virus tot expressie komen. Met behulp van deze laatste assay is het mogelijk om een individuele cel die geïnfecteerd is geraakt met een RCV aan te tonen. De aanvrager meldt verder dat door de producent meer dan 40 preklinische vaccins zijn gemaakt waarbij in geen enkele batch RCV kon worden aangetoond.

Naar de mening van de COGEM is de beschreven test in principe adequaat en voldoende gevoelig om de aanwezigheid van RCV in de te gebruiken batch te kunnen uitsluiten. Wel moet opgemerkt worden dat gegevens over hoe de  $\beta$ -galactosidase expressie gemeten wordt en wat de detectiedrempel hiervan is ontbreken. Ook ontbreken gegevens over de vectorinput in de test en hoe deze zich verhoudt tot de vectordosis waarmee de rhesusapen gevaccineerd worden. Door het ontbreken van deze gegevens is het moeilijk de RCV test op zijn juiste waarde te schatten.

Echter, gezien het feit dat het ontstaan van RCV zeer onwaarschijnlijk is, de beschreven test standaard wordt gebruikt door de producent om preklinische batches te testen en in 40 geproduceerde batches geen RCV kon worden aangetroffen, is de COGEM van mening dat kans op de aanwezigheid van RCV verwaarloosbaar klein is.

Bij de inschaling van vaccinatie van rhesusapen moet zowel het risico dat de laboratoriummedewerker blootgesteld wordt aan het virus als het risico op verspreiding buiten het dierverblijf in ogenschouw genomen worden. Hierbij is van belang of de geïnjecteerde virusdeeltjes kunnen vrijkomen en bijvoorbeeld door aërogene transmissie de medewerker kunnen infecteren. Ook de kans op recombinatie van de virale vector met eventuele in de aap aanwezige wildtype virussen, waardoor een nieuw chimeer virus met onbekende biologische eigenschappen kan ontstaan, moet worden afgewogen.

In de experimenten wordt gewerkt met een deficiënt virus. Na binnendringen van een cel kan het virus door de afwezigheid van structurele genen zich niet verder verspreiden in het geïnfecteerde dier of naar anderen dieren. De virale vector is dus biologisch ingeperkt.

Eventuele uitscheiding van vectordeeltjes zal dus beperkt blijven tot deeltjes afkomstig van de initiële vaccinatie. Alphavirussen worden verspreid door muggen.

Echter, van VEEV is bekend dat onder laboratoriumomstandigheden in enkele gevallen aëroge verspreiding heeft plaatsgevonden. SINV wordt veel gebruikt bij wetenschappelijk onderzoek maar aëroge verspreiding is nooit gerapporteerd. Zover bekend kan SINV alleen door muggen worden overgedragen. De VEE/SIN vectoren zijn ingepakt in de structurele eiwitten van het SINV. Dit betekent dat de virale vectordeeltjes de biologische eigenschappen van SINV-deeltjes bezitten. Na injectie in apen is er een kleine kans dat een minimale fractie van de geïnjecteerde deeltjes uitgescheiden wordt. Echter, gezien het feit dat deze deeltjes dezelfde eigenschappen als SINV zullen vertonen kan aëroge verspreiding uitgesloten worden.

Een eventueel risico bij het vaccineren van proefdieren is dat er recombinatie optreedt met in de dieren aanwezige wildtype virussen waardoor recombinante chimere virussen kunnen ontstaan met nieuwe eigenschappen. Daarnaast zou er complementatie kunnen optreden, waarbij een wildtype virus de verdere verspreiding van de virale vector faciliteert. Complementatie treedt alleen op tussen dezelfde virusspecies of zeer nauw verwante virussen. Voor recombinatie is een sterke overeenkomst (homologie) tussen de genoomsequenties van de virussen noodzakelijk.

Recombinatie tussen verschillende alphavirussen onder *in vitro* omstandigheden is beschreven (8, 9). Wel moet opgemerkt worden dat de replicatie-efficiëntie van de ontstane chimere virussen sterk verlaagd was en de virussen geattenuëerd waren in proefdieren (11, 12). Daarbij is bekend dat bij alphavirussen superinfecties niet mogelijk zijn. Cellen die geïnfecteerd zijn met een alphavirus kunnen niet nogmaals met hetzelfde of een nauw verwant virus worden geïnfecteerd. Het genoom van het tweede virus kan wel afgelezen worden maar niet gerepliceerd (10). Dit verlaagt de kans op het optreden van recombinaties sterk. Echter het optreden van recombinaties valt niet geheel uit te sluiten.

De kans op recombinatie is sterk afhankelijk van de sequentiehomologie tussen de te recombineren delen. VEEV en zijn vectormuggen komen niet voor in Nederland. Zover bekend is de aanwezigheid van SINV in Nederland nooit aangetoond (13). Virussen uit het zogenaamde VEE-complex komen niet in Europa voor. Ook virussen uit het WEE-complex, waartoe SINV behoort, komen in Nederland niet voor. De kans dat in Nederland gefokte rhesusapen geïnfecteerd zijn met VEEV of SINV of een nauw verwant virus is derhalve verwaarloosbaar klein. De sequentiehomologie tussen de verschillende niet nauw verwante alphavirussen is te laag om recombinatie *in vivo* te verwachten.

Uit het bovenstaande blijkt dat de kans op het optreden van recombinatie verwaarloosbaar klein is, als geëxperimenteerd wordt met in Nederland gefokte rhesusapen. Echter, de afkomst van de in de experimenten te gebruiken rhesusapen is onduidelijk. Het kunnen hier ook apen betreffen die geïmporteerd zijn. Het is derhalve niet uit te sluiten dat deze apen afkomstig zijn uit gebieden waar virussen uit het VEE-complex of WEE-complex endemisch voorkomen. Deze apen zouden mogelijk



geïnfecteerd kunnen zijn. Om elk eventueel risico uit te kunnen sluiten adviseert de COGEM daarom dat de rhesusapen getest worden op de aanwezigheid van alphavirussen.

De aanvrager is van plan om de dieren te vaccineren met combinaties van virale vectoren. Gezien het feit dat het hier replicatiedeficiënte vectoren betreft, en er geen sequentiehomologie is tussen de virale vectoren en de VEE/SIN vectoren acht de COGEM de kans op het optreden van recombinatie tussen de verschillende vectoren verwaarloosbaar klein. Immers replicatie is een noodzakelijke voorwaarde voor recombinatie.

#### *Advies*

Concluderend adviseert de COGEM, - dat gezien het feit dat er sprake is van werkzaamheden met een deficiënt virus dat zich niet kan verspreiden -, deze werkzaamheden in een DM-II dierversluit uitgevoerd kunnen worden, zonder dat de veiligheid voor mens of milieu in het geding komt. Het testen van de te vaccineren rhesusapen op de aanwezigheid van alphavirussen is noodzakelijk, omdat de herkomst van de apen onduidelijk is. Aangezien de kans op het optreden van aërogene verspreiding van de VEE/SIN vectoren verwaarloosbaar klein, is het nemen van aanvullende maatregelen zoals het dragen van mondkapjes door laboratoriummedewerkers niet noodzakelijk.

#### **Referenties**

1. Weaver, S.C. *et al.*, (2000). *Family Togaviridae* in Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, eds: Van Regenmortel, M.H.V. *et al.* Academic Press, San Diego. p879-889.
2. Knipe, M.D., Howley, P.M. (2001) Fields Virology. Alphaviruses p 917- 962. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
3. Berglund, P., Tubulekas, I., Liljestrom, P. (1996). Alphaviruses as vectors for gene delivery. Trends Biotechnol. **14**: 130-134.
4. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling 1998.
5. Polo, J. M., Belli, B.A., Driver, D.A., Frolov, I., Sherrill, S., Hariharan, M.J., Townsend, K., Perri, S., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M., Schlesinger, S., Dubensky, T.W. (1999). Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 4598-603.
6. Dubensky, T.W., Driver, D.A., Polo, J.M., Belli, B.A., Latham, E.M., Ibanez, C.E., Chada, S., Brumm, D., Banks, T.A., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M.(1996). Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. J. Virol. **70**: 508-519.

7. Perri S., Greer C.E., Thudium K., Doe B., Legg H., Liu H., Romero R.E., Tang Z., Bin Q., Dubensky T.W. Jr, Vajdy M., Otten G.R., Polo J.M. (2003). An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *J Virol.***77**:10394-403.
8. Strauss E.G., Strauss, J.H. (1997). Recombination in alphaviruses. *Semin. Virol.* **8**; 85-94.
9. Schoepp, R.J., Smith, J.F., Parker, M.D. (2002). Recombinant chimeric western and equine encephalitis viruses as potential vaccine candidates. *Virology* **302**: 299-308.
10. Karpf , A.R., Lenches, E., Strauss E.G., Strauss, J.H., Brown, D.T. (1997). Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with sindbis J. *Virol.* **71**: 7119-7123.
11. Paessler, S., Fayzulin R.Z., Anishchenko, M., Greene I.P., Weaver S.C., Frolov, I. (2003). Recombinant sindbis/Venezuelan equine encephalitis virus is highly attenuated and immunogenic. *J. Virology* **77**: 9278-9286.
12. Kuhn, R.J., Griffin, D.E., Owen, K.E., Niesters, H.G.M., Strauss, J.H. (1996). Chimeric sindbis-ross viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. *J. Virology* **70**: 7900-7909.
13. Kurkela, S., Manni, T., Vaheri A., Vapalahti, O., (2004). Causative agent of pogosta disease isolated from blood and skin lesions. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 889-894.