

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

DATUM 18 mei 2006
KENMERK CGM/060518-04
ONDERWERP Advies grootschalige productie van een vaccincomponent (IG 06-009)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende de grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van insectencellen en baculovirussen door Diosynth B.V. te Oss, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ontwerpbeschikking voor de grootschalige productie van een vaccincomponent, hemagglutinine, afkomstig uit influenzavirus. De vaccincomponent wordt geproduceerd met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) baculovirussen en insectencellen.

Risico's kunnen ontstaan wanneer gg-baculovirussen bij een calamiteit vrijkomen uit het gesloten productiesysteem, met een eventuele verspreiding in het milieu tot gevolg. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager voorgestelde maatregelen en werkprocedures adequaat zijn om te voorkomen dat baculovirus terecht komt in het milieu. De vloer van de inperkende ruimte beschikt over een 'lekdetectie' en eventuele lekkages kunnen via pompen afgevoerd worden naar een inactivatievoorziening.

Indien in het uitzonderlijke geval toch baculovirus vrijkomt uit het productiesysteem dan is de kans verwaarloosbaar klein dat het virus zich verder verspreidt. Het gastheerbereik van het baculovirus is beperkt tot enkele vlindersoorten en het recombinante virus heeft een sterk verminderde infectieusiteit ten opzichte van het wildtype virus.

Omdat het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als een groep 1 organisme, dienen de werkzaamheden, de Regeling ggo volgend, uitgevoerd worden onder inperkingsniveau MI-III. De COGEM acht de risico voor mens en milieu onder deze inperking verwaarloosbaar klein zijn. Zij merkt hierbij echter op dat, hoewel wettelijk gezien niet mogelijk, inschaling op het lagere MI-II niveau in dit specifieke geval ook voldoende is om de risico's verwaarloosbaar klein te maken.

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 loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

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

Grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van baculovirussen en insectencellen

COGEM advies CGM/060518-04

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ontwerpbeschikking van Bureau GGO betreffende de grootschalige productie van een vaccincomponent ten behoeve van een vaccin tegen influenza. De productie hiervan vindt plaats met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) baculovirussen in insectencellen. De aanvrager is voornemens om hemagglutinine (HA), afkomstig van influenza virus, te produceren in bioreactoren met een maximaal volume van 20.000 liter.

De aanvrager geeft aan dat de werkzaamheden kunnen worden uitgevoerd in een procesruimte onder inperkingsniveau MI-II aangezien het baculovirusexpressiesysteem biologisch ingeperkt is. Daarnaast geeft hij aan dat het expressiesysteem wereldwijd al tientallen jaren gebruikt wordt voor onderzoek en productie zonder dat schadelijke gevolgen voor het milieu zijn vastgesteld. Volgens de aanvrager hanteert het buitenland voor de onderhavige werkzaamheden een inperkingsniveau vergelijkbaar aan MI-II.

Bureau GGO schaaft de werkzaamheden echter in op MI-III-niveau conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) (1). In deze Regeling is een lijst opgenomen van zogenaamde groep 1 organismen. Dit zijn erkende en veilig bevonden systemen voor de vervaardiging van ggo's. Systemen die erkend zijn voor grootschalige werkzaamheden, worden ingeschaald op MI-I niveau. Wanneer de systemen niet erkend zijn voor grootschalige productie, maar uitsluitend voor kleinschalige (<10 liter) werkzaamheden, dan vindt inschaling op MI-II niveau plaats.

Voor een erkenning als groep 1 organisme dient het gehele construct, dus de gebruikte gastheer, het vectorvirus en het insert, erkend te worden. Aangezien het onderhavige construct niet erkend is als groep 1 organisme en de aanvrager geen erkenning aanvraagt, wordt het construct beschouwd als een groep 2 organisme. Uit de regeling ggo vloeit voort dat grootschalige handelingen met deze organismen verricht dienen te worden in een MI-III procesruimte.

Kenmerken van het GGO

De vaccincomponent Hemagglutinine wordt gecodeerd door het *HA* gen en is afkomstig van Influenzavirus-vaccinstammen. Het eiwit wordt grootschalig geproduceerd door het coderende gen te plaatsen in een expressievector die afgeleid is van het baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcNPV). Het *HA* gen wordt in insectencellen tot expressie gebracht. De kenmerken van het vectorvirus, het donororganisme en het gastheerorganisme worden hieronder besproken.

Baculovirus (vectorvirus)

Het baculovirus behoort tot de familie van de *Baculoviridae*. Virussen van deze familie kunnen ziekten veroorzaken bij een groot aantal verschillende soorten insecten. In het algemeen is het gastheerbereik van de verschillende virussen beperkt tot enkele insectensoorten binnen een genus of een familie. De larven van verschillende *Lepidoptera* soorten (orde van motten en vlinders) zijn gevoelig voor het onderhavige baculovirus AcNPV (2). Horizontale overdracht van baculovirussen vindt hoofdzakelijk via besmet voedsel plaats (3;4).

Bij sommige baculovirussen zijn de afzonderlijke virusdeeltjes omgeven door een envelop, terwijl bij andere baculovirussoorten de envelop meerdere virusdeeltjes omhult. Het door de aanvrager gebruikte baculovirus behoort tot deze laatste groep. Het genoom van het virus bestaat uit circulair dubbelstrengs DNA (2). Replicatie van de virussen vindt plaats in twee fasen, de zogenaamde vroege en late fase. Tijdens de late fase komen twee eiwitten in hoge mate tot expressie, polyhedrine en p10, onder invloed van de bijbehorende “sterke” promotoren (5). Door de aanwezigheid van deze promotoren zijn baculovirussen zeer geschikt als vector. Het gewenste gen kan namelijk direct na de promotor worden ingebouwd waardoor het recombinante eiwit tijdens de virale expressie in insectencellen in hoge mate geproduceerd wordt (5).

Baculovirussen kunnen zich onder insecten verspreiden via polyeders. Dit zijn eiwitstructuren die elk meerdere virionen bevatten en die noodzakelijk zijn voor het virus om buiten de cel te overleven. Polyeders zijn grote structuren die duidelijk zichtbaar zijn met een lichtmicroscop. De polyeders worden gevormd in de kern van een gastheer cel en komen vrij door kern desintegratie (2). Polyeders zijn opgebouwd uit polyhedrine eiwitten die gecodeerd worden door het *polyhedrine* gen.

Bij het gebruik van baculovirussen als vector, kan het gewenste gen op de plaats van het *polyhedrine* gen ingebouwd worden. Vanwege de insertie zijn deze virussen niet in staat om polyeders te vormen. Wanneer het virale DNA vrijkomt uit de cel is het niet meer omgeven door een polyeder en daardoor gevoelig voor milieuomstandigheden, zoals uitdroging en UV licht. Daarnaast is het DNA niet meer beschermd tegen

inactivatie of afbraak door het darmstelsel van het gastheerinsect. De afwezigheid van polyeders beperkt de overlevingsduur van het virale DNA in het milieu van een aantal maanden tot enkele uren/dagen. Een dergelijk virus is sterk verminderd infectieus ten opzicht van het wildtype virus (6;7;8;9).

Polyhedrine is niet noodzakelijk voor infectie en replicatie. Polyhedrine deletiemutanten zijn nog wel in staat om cellen in kweek te infecteren (2).

In de door de aanvrager voorgestelde werkzaamheden wordt gebruikt gemaakt van een baculovirusexpressievector waarin het *polyhedrine* gen is vervangen door het hemagglutinine gen.

Influenza A virus (donorvirus)

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus. Het is een RNA virus behorende tot de familie *Orthomyxoviridae* en onderverdeeld in drie typen, Influenza A, B en C (2;3). Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit verschillende gensegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder haemagglutinine (HA). Het HA-eiwit is mede een bepalende factor voor de pathogeniteit van influenza A virussen en de aanmaak van antistoffen tegen het virus. Daarnaast speelt het eiwit een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit (10).

Het onderhavige HA gen is afkomstig van Influenza vaccinstammen die beschikbaar zijn gesteld door de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO). Deze vaccinstammen zijn volledig gekarakteriseerd en missen de zogenaamde ‘basische klievingsplaats’. Uit influenza uitbraken in het verleden blijkt de aanwezigheid van een dergelijke plaats een belangrijke aanwijzing te zijn voor de pathogeniteit van het virus.

Insectencellen (gastheercellen)

Er wordt al een aantal jaren gebruik gemaakt van insectencellen voor de expressie van recombinante eiwitten met behulp van baculovirusexpressievectoren (11;12). Veel gebruikte insectencellijnen zijn afkomstig van de mot *Spodoptera frugiperda* (Sf), zoals de Sf9 cellen die door de aanvrager gehanteerd worden (2;11). De toepassing van insectencellen heeft een aantal voordelen. Als insectencellen gebruikt worden voor de expressie van eukaryotische recombinante eiwitten, is de kans dat de eiwitten biologisch actief zijn groter dan wanneer deze tot expressie gebracht worden in cellen van de bacterie *Escherichia coli* (11). Insectencellen kunnen namelijk veel post-translationele processen verrichten welke ook uitgevoerd worden in zoogdiercellen. De recombinante eiwitten worden door insectencellen op de juiste manier gevouwen en bovendien vinden post-translationele modificaties op de correcte wijze plaats (de glycosylering door insectencellen wijkt echter wel af van de glycosylering door zoogdiercellen) (11). Verder

zijn insectencellen eenvoudiger te kweken dan zoogdiercellen. Bovendien brengen insectencellen, bij een infectie met een baculovirus, recombinante eiwitten zeer hoog tot expressie (12).

Adviesvraag

De vergunningaanvrager is voornemens om het HA eiwit batchgewijs te produceren in een maximaal volume van 20.000 liter per batch. Hiertoe worden insectencellen in het laboratorium geïnfecteerd met gg-baculovirus en vermeerderd. Wanneer de opgekweekte hoeveelheid virus voldoende is, wordt het gebruikt om insectencellen in bioreactoren te infecteren. Voorafgaand hieraan test de aanvrager de insectencellijn op afwezigheid van micro-organismen en virussen.

Grootschalige productie

Wanneer de productie in de bioreactor van het recombinante HA eiwit een optimum bereikt heeft, vindt opzuivering plaats. Het zuiveringsproces begint met het scheiden van kweekmedium en geïnfecteerde cellen door centrifugatie. Alvorens het kweekmedium wordt afgevoerd via het riool, wordt het medium opgevangen in een inactivatievoorziening (zogenaamde 'killtankinstallatie'), alwaar een hittebehandeling volgt (minimaal 38 seconden bij een minimale temperatuur van 130°C) om aanwezig vrij baculovirus af te doden.

De geïnfecteerde cellen worden behandeld met een detergens (1% Triton X-100) om cel-geassocieerd virus af te doden. Deze behandeling leidt tot het uiteenvallen van cellen waardoor de baculovirussen vrijkomen, gevolgd door afdoding door desintegratie van de virusenvelop (13). De aanvrager valideert momenteel de inactivatiemethode voor productie op kleine schaal en zal tijdens het productieproces de werking van Triton X-100 verifiëren.

Na het inactiveren, draagt dieptefiltratie bij aan een verdere verwijdering van eventueel nog aanwezig virus. De hierop volgende processtappen om de uiteindelijke vaccincomponent te verkrijgen, zijn daarom vrij van intacte ggo's.

De inactivatieprocedure wordt door de aanvrager beschouwd als een kritische stap in het gehele proces. Om fouten en daarmee onvolledige inactivatie te voorkomen neemt de aanvrager extra controlemaatregelen. Bij essentiële processtappen zoals het toevoegen van het detergens, is dubbele parafering een vereiste procedure.

Productieproces

De aanvrager maakt gebruik van roestvrij stalen bioreactoren die een gesloten systeem vormen. Tevens geschiedt monsternamen via gesloten systemen. Tijdens het proces vinden

geen open handelingen plaats. De procesfaciliteit voldoet aan de voorschriften zoals omschreven in de Regeling ggo (1).

Voorafgaand aan elke procesrun worden de bioreactoren getest op lektheid en de luchttoevoer- en afvoerfilters op integriteit. De productiefaciliteiten zijn opgenomen in een plan voor periodieke inspectie en onderhoud zodat een goede staat van de faciliteit gewaarborgd is. Apparatuur die intacte ggo's bevat of daarmee in aanraking is geweest, wordt na de werkzaamheden vrijgemaakt van ggo's door 'cleaning in place' of door autoclaveren. Vloeibaar afval wordt geautoclaveerd of gedecontamineerd door verhitting in de killtankinstallatie. Besmet vast afval wordt gedecontamineerd door 'cleaning in place' of autoclaveren.

De aanvrager geeft aan dat ggo's in geval van een calamiteit kunnen vrijkomen uit de reactoren als gevolg van lekkage van appendages of falen tijdens de gesloten monsternamen. Indien lekkage van de appendage optreedt, zal maximaal 5% (maximaal 1000 liter) van het reactorvolume vrijkomen in de reactorhal. Bij incidenten tijdens monsternamen bedraagt dit circa 1%. Volgens de aanvrager blijft deze hoeveelheid vrijgekomen materiaal beperkt vanwege in de bioreactoren aanwezige niveaudetecties en alarmering. Lekkages worden opgevangen op de werkvloer, welke voorzien is van lekdetectie. Als gevolg van verhoogde drempels, kan de vloer de grote 'spills' opvangen. De werkvloer zal voor aanvang van het productieproces worden aangesloten op de inactivatievoorziening door middel van verschillende pompen.

In de werkinstructie zijn procedures opgenomen hoe te handelen bij lekkage. Dit houdt onder andere in dat bij een lekkage verspreiding van het materiaal op de werkvloer voorkomen wordt door indammen, dat het materiaal opgenomen wordt en dat het besmette oppervlak gedesinfecteerd (bijvoorbeeld 1500 ppm chloorbleekloog gedurende 30 minuten) wordt. Volgens de aanvrager bestaat er geen kans dat vrijgekomen ggo-houdend materiaal buiten het gebouw komt. In noodgevallen kan desgewenst de volledige inhoud van de bioreactoren worden opgevangen en afgedood (hittebehandeling) in de killtankinstallatie.

Ontwerpbeschikking

Bureau GGO schaaft de werkzaamheden in op MI-III niveau aangezien het ggo niet is erkend als groep 1 organisme. Dit is conform de Regeling ggo (1).

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ontwerpbeschikking betreffende de grootschalige productie van een vaccincomponent afkomstig van Influenza A vaccinstammen met behulp van een gg-baculovirus in insectencellen.

Risico's kunnen bij grote uitzondering ontstaan wanneer in geval van onvoorziene omstandigheden, zoals lekkage van de appendage, ggo's vrijkomen uit de bioreactoren in de productieruimte. Dit zou tot verspreiding in het milieu kunnen leiden met een eventuele infectie van de gastheer als gevolg. Om de kans op het vrijkomen en het risico van verspreiding van het ggo te bepalen, worden de mate van fysieke inperking van het productiesysteem én de eigenschappen van het ggo beoordeeld.

Productieproces

Het gehele productieproces vormt een gesloten systeem om te voorkomen dat ggo's vrijkomen in het milieu. De aanvrager heeft een groot aantal maatregelen getroffen om de fysieke inperking van het productiesysteem te optimaliseren. Het productiesysteem voldoet hiermee aan de voorschriften zoals gesteld voor een MI-III procesruimte in de Regeling ggo (1). Dit betekent onder meer dat filters geplaatst zijn in de aan- en afvoerkanalen van gassen en dat de gehele inhoud van een bioreactor geïnactiveerd kan worden door afvoer naar killtankinstallaties (via een gesloten systeem). Daarnaast acht de COGEM de beschreven reinigingsmaatregelen na afloop van de werkzaamheden, zoals vermeld in de aanvraag, voldoende.

Voor aanvang van de werkzaamheden test de aanvrager de bioreactoren op lekdichtheid en wordt de integriteit van de filters van de toe- en afvoerkanalen getest. Indien alles naar behoren functioneert, wordt de productie van de vaccincomponent gestart. Als de productie een optimum heeft bereikt, wordt de kweek geoogst en het eiwit opgezuiverd tot het uiteindelijke product. Deze zuiveringsstappen behelzen onder andere het inactiveren van nog actief recombinant baculovirus dat overigens verzwakt is door de deletie van het *polyhedrine* gen. Om resterend geattenuëerd baculovirus geheel te inactiveren, wordt het oogstmateriaal behandeld met 1% Triton X-100. De COGEM is van mening dat het werkingsmechanisme, te weten het solubiliseren van celmembranen, een effectieve manier vormt om virusdeeltjes te inactiveren. Uit de literatuur blijkt dat een behandeling met 1% Triton X-100 binnen 30 minuten leidt tot volledige inactivatie van een virusstock met titer 10^7 pfu/ml (13). Naar de mening van de COGEM is de inactivatie van gg-virus bij kleinschalige handelingen niet eenvoudig door te trekken naar grootschalige productie. Zij merkt hierbij op dat voor een goede werking van Triton X-100, deze homogeen door de batch verspreid moet zijn. De COGEM adviseert daarom om het inactivatieproces te valideren.

De bioreactoren beschikken over niveaudetectie en een alarm zodanig dat bij een eventuele calamiteit maximaal 5% van de inhoud (1000 liter) vrijkomt. Verder beschikt de vloer over een lekdetectie en een alarm. Dit alles moet voorkomen dat de totale inhoud van de reactor vrijkomt. Voor het uitzonderlijke geval dat de totale inhoud toch vrijkomt, worden drempels in het productiegebouw verhoogd en pompen aangebracht om de vrijgekomen hoeveelheid materiaal af te voeren naar killtankinstallaties. De COGEM merkt op dat in de werkinstructie het gebruik van deze pompen (voor het opvangen en afvoeren van grote spills) ontbreekt en beschreven dient te worden. De COGEM is van mening dat de overige werkinstructies voldoende omschreven zijn.

Na het verwijderen van vrijgekomen materiaal hanteert de aanvrager een desinfectieprocedure waarbij chloorbleekloog gebruikt wordt. Naar de mening van de COGEM is deze procedure adequaat om eventueel nog aanwezig ggo volledig af te doden.

Gezien het bovenstaande, en de overige door de aanvrager opgestelde maatregelen, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat ggo's tijdens het productieproces uit het gesloten systeem vrijkomen. Indien, als gevolg van een calamiteit, ggo's vrijkomen in de productieruimte dan is de kans dat deze organismen buiten de ingeperkte ruimte, en dus in het milieu, terecht komen, verwaarloosbaar klein.

Eigenschappen van het ggo

Het gehanteerde recombinante baculovirus mist een functioneel *polyhedrine*-gen, waardoor het virus geen polyhedrine-eiwitten meer produceert. Dit leidt ertoe dat er geen polyeders gevormd worden met als gevolg dat het virale DNA niet beschermd is tegen milieu-invloeden, zoals UV. Uit de literatuur blijkt dat de overleving van dit baculovirus in het milieu van korte duur is, waardoor de kans op een succesvolle besmetting van de natuurlijke gastheer zeer klein wordt (6;7;8;9).

Baculovirussen hebben van nature slechts enkele insectensoorten als gastheer, hiervan komen enkele soorten ook in Nederland voor, zoals de floridamol (*Spodoptera exigua*) en de kooluil (*Mamestra brassicae*) (14;15). De afwezigheid van polyeders heeft echter tot gevolg dat het gehanteerde recombinante baculovirus een sterk verminderde infectieusiteit heeft ten opzicht van het wildtype virus. Het virusdeeltje wordt niet langer beschermd tegen inactivatie of afbraak door het darmstelsel van het gastheerinsect

Hoewel baculovirussen zoogdiercellen kunnen infecteren, zijn zij niet in staat om in deze cellen te repliceren, ook niet *in vitro* (2;16). In meerdere studies is tevergeefs getracht om baculovirussen, of antilichamen tegen het virus, uit zoogdieren te isoleren (17;18).

Het HA eiwit is een viraal envelop eiwit. De COGEM is van mening dat het HA eiwit theoretisch gezien functioneel in het membraan, en mogelijk ook in de envelop, van het baculovirus opgenomen kan worden. Naar de mening van de COGEM leidt inbouwen van het HA eiwit echter niet tot een hogere fitness van het gg-virus of tot verandering van het gastheerbereik.

De COGEM is van mening dat indien het ggo onverhoopt vrijkomt in het milieu, de risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De afwezigheid van polyeders verkleint de overlevingskans aanzienlijk en vanwege het zeer beperkte gastheerbereik is de kans op besmetting van insecten verwaarloosbaar klein is. De kans dat medewerkers van de productiefaciliteit geïnfecteerd raken als gevolg van contact met het ggo, is eveneens niet aannemelijk. De mens is geen natuurlijke gastheer.

Conclusie

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige productie van hemagglutinine met behulp van baculovirussen en insectencellen. Omdat het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als een groep 1 organisme, schaaft Bureau GGO de werkzaamheden in op inperkingsniveau MI-III. De COGEM is van mening dat de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is onder dit inperkingsniveau omdat de kans dat het ggo tijdens de werkzaamheden in het milieu terechtkomt en het risico als gevolg hiervan, verwaarloosbaar klein is.

De COGEM merkt hierbij op dat gezien de aard van het ggo, in dit specifieke geval, inschaling op MI-II niveau ook voldoende inperking zal bieden. Een MI-II ruimte dient, volgens de Regeling ggo, bijvoorbeeld ook te beschikken over een voorziening om de totale inhoud van het gesloten systeem op te vangen. Inschaling op dit lagere niveau is formeel echter niet mogelijk. De combinatie van de gehanteerde expressievector, het insert en de gastheercellen is niet erkend als een groep 1 organisme.

Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerd organismen. Mei 2004.
2. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (2001). Fields Virology. 4e druk. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
3. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.

4. Zhou, M., Sun, X., Sun, X., Vlak, J.M., Hu, Z. en Van der Werf, W. (2005). Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolydrovirus. *J. Invertebr Pathol* 89(2): 165-175.
5. Possee, R.D. (1997). Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 569-572.
6. ACGM compendium of guidance (2000). Guidance from the health and safety commission's advisory committee on genetic modification. Annex III, Guidance on commonly used viral vectors. Internet: HSE <http://www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgmcomp/2b3.pdf> (21 april 2006).
7. Hamblin, M., Van Beek, N.A.M., Hughes, P.R. en Wood, H.A. (1990). Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedron gene. *Appl Environ Microbiol* **56**(10): 3057-3062.
8. Wood, H.A. en Granados, R.R. (1991). Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 69-87.
9. Bishop, D.H.L., Entwistle, P.F., Cameron, I.R., Allen, C.J. en Possee, R.D. (1988). Field trials of genetically-engineerde baculovirus insecticides, p. 143-179. In: Sussman, M., Collins, C.H., Skinner, F.A. en Stewart-Tull, D.E. The release of genetically-engineerd microorganisms. Academic Press, Inc., New York.
10. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**: 196-209.
11. Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B., and Marz, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* **16**: 109-23.
12. Ikonomidou, L., Schneider, Y.J. en Agathos, S.N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 1-20.
13. Rueda, P., Fominaya, J., Langeveld, J.P.M., Brusckke, C., Vela, C. en Casal, J.I. (2001). Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* **19**: 726-734.
14. R. de Vos. Trekvinderregistratie Nederland. Internet: <http://www.science.uva.nl/-ZMA/entomology/Trekvlinder.html> (3 mei 2006).
15. Waarneming.nl. De site voor alle natuurwaarnemingen. Internet: <http://www.waarneming.nl> (3 mei 2006).
16. Kitagawa, Y., Tani, H., Limn, C.K., Matsunaga, T.M., Moriishi, K. en Matsuura, Y. (2005). Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculovirus. *J. Virol.* **79** (6): 3639-3652.
17. Doller, G., Groner, A., and Straub, O.C. (1983). Safety evaluation of nuclear polyhedrosis virus replication in pigs. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1229-33.
18. Gröner, A. (1986). Specificity and safety of baculoviruses, p.177-202. In R.R. Granados and B.A. Federici (eds), *The biology of baculoviruses*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.