

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 oktober 2020
KENMERK CGM/201028-02
ONDERWERP Advies immunisatie van niet-humane primaten met gg-ORFV D1701 vaccivirus tegen COVID-19

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Immunogeniciteit van SARS-CoV-2 ORFV vaccins in apen' (IG 20-030_2.8-001), ingediend door het Biomedical Primate Research Centre in Rijswijk, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) COVID-19 kandidaatvaccins gebaseerd op *ORF virus* (ORFV) vaccinstam D1701-VrV. In het genoom van de gg-virussen worden verschillende eiwitten van SARS-CoV-2 tot expressie gebracht (S1, S2, N, of S2+N). De aanvrager is voornemens met de gg-ORFV D1701-VrV virussen vaccinatieproeven bij niet-humane primaten uit te voeren.

SARS-CoV-2 heeft de mens als gastheer en is de veroorzaker van COVID-19. De COGEM heeft SARS-CoV-2 als klasse 3 pathogeen geclassificeerd. ORFV kan acute huid- en slijmvliessaandoeningen bij schapen en geiten veroorzaken. Vaccinstudies bij verscheidene zoogdiersoorten hebben aangetoond dat recombinante ORFV D1701-VrV vaccins veilig en effectief zijn toe passen tegen verscheidene virale infecties. De verzwakte vaccinstam ORFV D1701-VrV is avirulent en kan na infectie geen nieuwe virusdeeltjes vormen (replicatie incompetent).

De COGEM is van oordeel dat insertie van de S1-, S2, N-, of S2+N- sequenties van SARS-COV-2 niet zal leiden tot een verhoogde virulentie of tropismeandering van de avirulente ORFV D1701-VrV vector.

Indien de werkzaamheden op inperkingniveaus DM-II en ML-II worden uitgevoerd, in combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Immunisatie van niet-humane primaten met genetisch gemodificeerde ORFV D1701-VrV COVID-19 kandidaatvaccins

COGEM advies CGM/201028-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)virusvaccins gebaseerd op *ORF virus* (ORFV) vaccinstam D1701-VrV (IG 20-030). De aanvrager, het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk, is voornemens werkzaamheden uit te voeren met recombinante ORFV D1701-VrV virussen waarin (delen van) genen die coderen voor verschillende eiwitten van *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV-2), worden geïnsereerd. Ten behoeve van vaccinontwikkeling tegen COVID-19, is de aanvrager voornemens deze gg-ORFV D1701-VrV virussen aan niet-humane primaten toe te dienen. De aanvrager verzoekt de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau II uit te mogen voeren.

1.1 ORF virus

Het *ORF virus* ((ORFV), ook wel bekend als parapoxvirus ovis) is een pokkenvirus met een lineair dubbelstrengs DNA-genoom van ongeveer 135 kb. ORFV behoort tot het genus *Parapoxvirus* binnen de familie *Poxviridae*.¹ ORFV is de veroorzaker van de besmettelijke ziekte genaamd orf. Andere benamingen zijn onder meer zere bekjes, bekschurft, ecthyma contagiosum, infectieuze pustuleuze dermatitis, ‘scabby mouth’ of ‘Lippen- und Frussgrind’. ORFV komt wereldwijd endemisch voor bij schapen en geiten en veroorzaakt acute huid- en slijmvliesaanandoeningen. Verder kunnen onder meer koeien, rendieren, katten en kamelen met ORFV geïnfecteerd raken; ook komen zoönotische infecties bij de mens voor.²

Een ORFV infectie veroorzaakt bij schapen en geiten laesies rond de bek, oogleden, neusgaten orale slijmvliezen en spenen. Er ontstaan zweren die openbarsten, korsten krijgen en kunnen gaan etteren. Uiteindelijk drogen de aangetaste plekken op en binnen 6-8 weken treedt in de meeste gevallen volledig herstel op zonder littekenvorming. Het virus verspreidt zich niet systemisch vanaf de initiële plek van infectie. De ziekte is erg besmettelijk en de morbiditeit binnen een getroffen kudde is hoog. De mortaliteit is meestal minder dan 1%, hoewel dit percentage hoger is bij jonge dieren. Secundaire bacteriële en schimmelinfecties kunnen het ziektebeeld verergeren.^{2,3}

Orf is een beroepsgebonden zoönose en schapen- en geitenhouders, dierenartsen, personeel van schapenslachterijen en slagers hebben een verhoogd risico op infectie.^{4,5} ORFV infecties bij de mens vinden plaats via een huidbeschadiging en contact met de slijmvliezen, laesies en korsten van geïnfecteerde schapen of geiten, of bijvoorbeeld door het geven van de fles aan lammeren of het uit de hand voeren van schapen of geiten die besmet zijn. ORFV kan lange tijd infectieus blijven buiten het dier, bijvoorbeeld in de afgevalen korsten. Daardoor kan het virus ook indirect via besmette materialen overgedragen worden (fomites), zoals via kleding, messen, staldeuren of stro, maar ook via dierlijke producten zoals wol, dierenhuiden en vlees.^{4,5,6}

Infectie bij de mens veroorzaakt knobbeltjes op de huid van vingers, handen of onderarmen, waarna er blaasjes ontstaan die overgaan in etterende blaren die gemakkelijk bloeden. Uiteindelijk worden de

blaren bedekt met droge dikke korsten die zonder littekenvorming verdwijnen. Humane infecties hebben een zelflimiterend beloop en er treedt spontaan herstel op binnen enkele weken.^{3,4,5} Er wordt in de literatuur melding gemaakt van enkele gevallen van mens-op-mens transmissie.⁶

1.2 Totstandkoming van de D1701-VrV vaccinstam

De aanvrager is voornemens de verzwakte recombinante ORF vaccinstam genaamd D1701-VrV als virale vector toe te passen om verschillende SARS-CoV-2 eiwitten tot expressie te brengen. ORFV D1701-VrV is een recombinant van de ORFV stam D1701-V, welke is afgeleid van de ORFV stam D1701 die weer afstamt van een ORFV isolaat uit schapen. Dit wordt hieronder kort toegelicht.

ORFV stam D1701 is gegenereerd door een ORFV isolaat uit schapen te verzwakken door deze serieel te passeren op primaire schapen- en rundercellen.⁷ Genomische karakterisering laat zien dat door deze celkweekadaptatie grote genomische herschikkingen zijn opgetreden (duplicaties, deleties, transposities) in ORFV D1701, waardoor deze stam een vergrote ‘inverted terminal repeat’ (ITR) regio (18 kbp) heeft en een groter genoom (~158 kbp) in vergelijking met wildtype ORFV stammen.^{8,9,10} Deze levend verzwakte ORFV D1701 stam is in meerdere landen geregistreerd als vaccin tegen orf en is vrijwel apathogeen in schapen.⁷ Scarificatie van schapen met ORFV D1701 veroorzaakt milde huidlaesies en induceert immuniteit tegen ORFV infectie die ongeveer 4-6 maanden duurt.³

Seriële passage van ORFV D1701 op Vero cellen heeft geresulteerd in een variant genaamd ORFV D1701-V die door drie additionele genomische deleties, variërend tussen ~2 en ~3,7 kbp in grootte, nog verder verzwakt is.^{8,10,13} Deze zogenaamde ORFV D1701-V stam is apathogeen voor schapen (de natuurlijke gastheer) ook als het immuunsysteem wordt onderdrukt.⁹

In de onderhavige studie wordt ORFV D1701-VrV als ‘basis construct’ voor de gg-COVID-19 kandidaatvaccins gebruikt (zie §1.4). In de van D1701-V-afgeleide ORFV D1701-VrV stam is de sequentie die codeert voor de virale virulentiefactor VEGF-E (VrV) vervangen door het LacZ gen van *Escherichia coli*.^{8,10,11}

1.3 Toepassing van ORFV D1701- VrV als recombinant virusvaccin

ORFV D1701-VrV wordt al enige tijd gebruikt als virale vector om vaccins tegen verschillende virale infecties te ontwikkelen, door op de plek van het LacZ gen (oorspronkelijk het VEGF-E locus) een gen van interesse te insereren.¹² Doordat het transgen onder controle staat van de originele ‘early promoter’ van VEGF-E, is expressie van het transgen voorafgaand aan ORFV DNA-replicatie mogelijk en is er geen replicatie of productie van infectieus recombinant virus nodig.^{12,13}

ORFV D1701-VrV kan onder celkweekomstandigheden vermeerderd worden in permissieve cellijnen, maar kan *in vivo* niet productief repliceren. De replicatie van ORFV kan worden onderverdeeld in ‘early’, ‘intermediate’ en ‘late’ replicatie-fasen. De replicatiecyclus van ORF D1701-VrV is *in vivo* geblokkeerd in de late replicatie-fase. ORFV D1701-VrV kan daardoor nog wel de zogenaamde ‘early’ en ‘intermediate’ genen, én eventueel aanwezige recombinante genen, tot expressie brengen, maar de virale genen die onder controle staan van de ‘late’ promoters in de ‘late’ replicatiefase komen niet tot expressie. Hierdoor kunnen geen nieuwe infectieuze vectordeeltjes gevormd worden.

Vaccinatie studies bij verscheidene zoogdiersoorten (onder andere konijnen, honden, katten, muizen, varkens, ratten) hebben aangetoond dat recombinante ORFV D1701-VrV vaccins een sterke en langdurige immuunreactie bij de gastheer kunnen oproepen tegen verscheidene virale infecties (waaronder pseudorabies virus, *Influenza A virus*, Borna disease virus, rabbit hemorrhagic disease virus, classical swine fever). Er zijn hierbij geen indicaties voor pathogeniteit veroorzaakt door ORFV D1701-VrV-afgeleide vaccins en in geen van de studies werden na infectie met de vaccinvector nieuwe infectieuze recombinante virusdeeltjes gevormd.^{10,14,15,16,17,18,19,20,21,22}

1.4 De gg-ORFV D1701-VrV virussen

De aanvrager wil onderzoek uitvoeren met gg-virusvaccins die bescherming moeten bieden tegen infectie met SARS-CoV-2. Voor de productie van de gg-virusvaccins wordt gebruik gemaakt van de virale vector ORFV D1701-VrV, waarbij de hierin aanwezige LacZ insertie vervangen is door (delen van) genen die coderen voor verschillende SARS-CoV-2 eiwitten. De productie van de gg-vaccins vindt elders plaats en maakt geen onderdeel uit van de onderhavige vergunningaanvraag. De aanvrager wil niet-humane primaten met de volgende gg-ORFV D1701-VrV virussen vaccineren:

- gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-S1: hierin is de LacZ insertie van rORF D1701-VrV vervangen door het gen coderend voor Spike glycoproteïne subunit 1 (S1) van SARS-CoV-2
- gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-S2: hierin is de LacZ insertie van rORF D1701-VrV vervangen door het gen coderend voor Spike glycoproteïne subunit 2 (S2) van SARS-CoV-2
- gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-N: hierin is de LacZ insertie van rORF D1701-VrV vervangen door het gen coderend voor het nucleocapside (N) van SARS-CoV-2
- gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-S2-N: hierin is de LacZ insertie van rORF D1701-VrV vervangen door de genen coderend voor de S2- en N-eiwitten van SARS-CoV-2

De in de gg-ORFV D1701-VrV aanwezige coderende sequenties voor SARS-CoV-2 eiwitten zijn afkomstig van referentiesequenties uit Genbank (NCBI Reference Sequence: YP_009724397.2 (N-eiwit), NCBI Reference Sequence: YP_009724390.1 (S1- en S2-eiwit (AA1 - AA690 of AA697 – AA1288))).

1.5 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om niet-humane primaten (resusapen en/of cynomolgusmakaken) met de verschillende gg-ORFV D1701-VrV COVID-19 kandidaatvaccins te immuniseren. De apen worden per paar in kooien, met meerdere kooien per kamer, gehuisvest. Na immunisatie zullen de dieren onder verdoving op regelmatige tijdstippen worden gebleed. Dit bloed zal gebruikt worden voor hematologisch en biochemisch onderzoek om de opgewekte afweerreacties te analyseren. Aan het eind van het experiment zullen de dieren geëuthanaseerd worden en weefselmonsters voor verdere analyse worden afgenomen.

De aanvrager is voornemens de werkzaamheden met de gg-vaccins in associatie met apen op DM-II, en het onderzoek met materiaal afkomstig van het DM-II diervverblijf in het ML-II laboratorium in het BPRC uit te voeren. Hierbij neemt de aanvrager een aantal beschermingsmaatregelen in acht waarvan

een deel standaard is voor werkzaamheden op ML-II en DM-II. De volgende beschermingsmaatregelen zullen in acht genomen worden:

- Werkzaamheden met materialen afkomstig van apen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet klasse 2;
- Bij de werkzaamheden op DM-II is het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hoger) en een beschermende bril verplicht;
- In de DM-II werkruimte dragen alle medewerkers werkkleding (laarzen, overall, handschoenen, mondkapje, haarnetje). Laarzen worden bij het verlaten van de werkruimte gedompeld in decontaminatie vloeistof. Haarnetje, mondkapje en handschoenen worden weggegooid en afgevoerd;
- Feces en urine, en water dat is gebruikt voor het schoonmaken van de ruimtes, worden geautoclaveerd voordat deze worden afgevoerd.

2. Eerdere COGEM adviezen

SARS-CoV-2 is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²³ De ORFV vaccinstam D1701 staat in Bijlage 4 van de Regeling ggo vermeld als strikt dierpathogeen klasse 2.²⁴ De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-ORFV.

3. Overwegingen

De aanvrager is voornemens de recombinante ORFV D1701-VrV stam als virale vector toe te passen om (delen van) van genen coderend voor SARS-CoV-2 eiwitten tot expressie te brengen en deze gg-ORFV D1701-VrV virussen aan niet-humane primaten toe te dienen. De aanvrager verzoekt de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau II uit te mogen voeren. Voor de overweging van de inschaling van deze werkzaamheden spelen een aantal aspecten een rol, die hieronder puntsgewijs zullen worden behandeld.

3.1 Virulentie van de gg-ORFV D1701-VrV virussen

De virale vector is afgeleid van ORFV vaccinstam D1701-V, een stam die apathogeen is in schapen (de natuurlijke gastheer).⁹ Vaccinstudies bij verscheidene zoogdiersoorten hebben aangetoond dat recombinante ORFV D1701-VrV vaccins veilig en effectief zijn toe passen tegen verscheidene virale infecties. De COGEM is van oordeel dat er voldoende wetenschappelijk bewijs is dat de ORFV-VRV avirulent is en *in vivo* niet productief kan repliceren; na infectie kunnen geen nieuwe infectieuze vectordeeltjes gevormd worden. In de onderhavige studie zullen in de rORFV D1701-VrV stam (delen van) genen die coderen voor verschillende SARS-CoV-2 eiwitten (S1, S2, N, of S2+N) tot expressie worden gebracht. De COGEM is van oordeel dat deze SARS-CoV-2 eiwitten het replicatie-defect van ORFV D1701-VrV niet kunnen opheffen en niet tot een virulentieverhoging zullen leiden. Zij is van oordeel dat de gg-ORFV D1701-VrV virussen met SARS-CoV-2 eiwitten net als de uitgangsstam geattenuëerd en avirulent zijn.

3.2 Pseudotypering gg-ORFV D1701-VrV virussen

De aanvrager stelt dat de aanwezigheid van SARS-CoV-2 eiwitten in de ORFV D1701-VrV virusvector geen effect zal hebben op het tropisme van de vector.

Het structurele SARS-CoV-2 N-eiwit is intern gelokaliseerd in virusdeeltjes. Het S-eiwit van SARS-CoV-2 is een glycoproteïne dat geïntegreerd is in de virale envelop. Het S-eiwit bestaat uit twee subeenheden: S1 bevat het receptor-binding domain' (RBD) en is betrokken bij de binding aan de receptor op de gastheercel, terwijl S2 membraanfusie faciliteert. De COGEM acht pseudotypering van de gg-ORFV D1701-VrV virussen door het S2-subunit en N-eiwit van SARS-CoV-2 niet mogelijk. De COGEM kan niet geheel uitsluiten dat het SARS-CoV-2 S1-subunit (bevat het RBD) in het membraan van gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-S2 of gg-ORFV D1701-VrV-CoV2-S2-N opgenomen kan worden. Voor zover bij de COGEM bekend zijn er echter geen publicaties waarin beschreven wordt dat pseudotypering van pokkenvirussen, met oppervlakte-eiwitten van andere virussen (d.w.z. anders dan pokkenvirussen) mogelijk is. In het theoretische geval dat er pseudotypering optreedt, acht de COGEM het risico hiervan verwaarloosbaar klein gezien het niet-replicerende karakter van de gg-ORFV D1701-VrV virussen.

3.3 Recombinatie

De rORFV D1701-VrV virussen zullen worden toegediend aan niet-humane (resusapen en/of cynomolgusmakaken). Recombinatie kan optreden wanneer verwante virussen gelijktijdig dezelfde cel infecteren. De COGEM acht de kans dat door recombinitie met wildtype ORF of verwante pokkenvirussen de drie genomische deleties (variërend tussen ~2 en ~3,7 kbp in grootte) die in ORFV D1701 aanwezig zijn hersteld kunnen worden, verwaarloosbaar klein. In een 'worst case scenario' zou de transgene sequentie (de SARS-CoV-2 genen) na recombinitie in een wildtype (pokken)virus terecht kunnen komen. Een vereiste hiervoor is dat een verwant pokkenvirus ook apen kan infecteren. De COGEM is niet bekend met virussoorten uit het genus *Parapoxvirus* die van nature apen infecteren. Bekende pokkenvirussen uit andere genera die infecties bij niet-humane primaten kunnen veroorzaken zijn bijvoorbeeld *Monkeypox virus* (genus *Orthopoxvirus*), *Tanapox virus* (genus *Yatapoxvirus*), *Yaba monkey tumor virus* (genus *Yatapoxvirus*). Mede gezien het feit dat deze virussen zeer zeldzaam zijn en de niet-humane primaten waarmee de aanvrager voornemens is te gaan werken 'specific pathogen free' (SPF) zijn, acht de COGEM de kans op recombinitie tussen de gg-virussen en verwante virussen verwaarloosbaar klein.

4. Conclusie en advies

Concluderend is de COGEM van oordeel dat insertie van de S1-, S2, N-, of S2+N- sequenties van SARS-COV-2 niet zal leiden tot een verhoogde virulentie of tropisme verandering van de avirulente ORFV D1701-VrV vector welke in Bijlage 4 van de Regeling ggo vermeld staat als strikt dierpathogeen klasse 2. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn als de voorgenomen werkzaamheden met gg-ORFV D1701-VrV virussen met SARS-CoV-2 eiwitten (S1, S2, N, of S2+N) in associatie met niet-humane primaten op DM-II niveau en de activiteiten met cellen die afkomstig zijn van deze dieren op ML-II worden uitgevoerd.

In de DM-II ruimte is de aanvrager voornemens de apen per paar in kooien, met meerdere kooien per kamer, te huisvesten. Dit wijkt af van het standaard aanvullende voorschrift dat geldt voor activiteiten met grote zoogdieren in associatie met gg-virussen op DM-II niveau (Regeling ggo artikel 9.1.6.2.3.7),

namelijk dat de huisvesting van en alle handelingen met de dieren plaats dient te vinden in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd. De aanvrager hanteert in plaats daarvan de volgende aanvullende voorschriften bij de werkzaamheden op DM-II:

- Tijdens de werkzaamheden is het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hoger) en een beschermende bril verplicht;
- Naast het dragen van passende beschermende kleding wordt tijdens de werkzaamheden apart schoeisel gedragen. Na afloop wordt de kleding en het schoeisel achtergelaten in de werkruimte.

Gezien de infectieroute van ORFV, zijn daarnaast conform Regeling ggo (artikelen 9.1.1.3.3.10, 9.1.1.3.3.12 en 9.1.6.2.3.11), de voorschriften voor activiteiten met ggo's die infectieus zijn via wondjes en die zich via gebruiksvoorwerpen kunnen verspreiden van bij de werkzaamheden op DM-II en ML-II van toepassing; het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding, en in het geval van de ML-II werkzaamheden het uitvoeren van alle open handelingen in een klasse II veiligheidskabinet.

Concluderend stemt de COGEM in met de voorschriften gericht op bescherming van de medewerker (mond- en neuskapje, beschermende bril, handschoenen, open handelingen in klasse II veiligheidskabinet) en signaleert dat deze maatregelen vanuit ARBO-overwegingen noodzakelijk zijn. Daarnaast adviseert de COGEM om te voorkomen dat derden aan de ggo's worden blootgesteld, maatregelen gericht op het voorkomen van uitsleep en verspreiding van de gg-virussen naar het milieu via gebruiksvoorwerpen in acht te nemen (zoals het dragen van apart schoeisel en het dragen van beschermde kleding).

Indien de werkzaamheden op inperkingniveau DM-II en ML-II worden uitgevoerd, in combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses(ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 20 oktober 2020)
2. Wang *et al.* (2019). *Orf virus*: A promising new therapeutic agent. *Rev. Med. Virol.* 29: e2013
3. Hosamani M. *et al.* Orf: an update on current research and future perspectives. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 7: 879-893
4. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Orf Richtlijn. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/orf> (bezocht: 20 oktober 2020)
5. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). <https://www.rivm.nl/orf> (bezocht: 20 oktober 2020)
6. Caravaglio JV & Khachemoune A (2017). Orf Virus Infection in Humans: A Review With a Focus on Advances in Diagnosis and Treatment. *J. Drugs. Dermatol.* 16: 684-689

7. Mayr A *et al.* (1981). Control of ecthyma contagiosum (pustular dermatitis) of sheep with a new parenteral cell culture live vaccine. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 28: 535–549. [In German]
8. Cottone R *et al.* (1998). Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res.* 56: 53-67
9. Rziha H *et al.* (2000). Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign gene. *J. Biotechnol.* 83: 137-145
10. Büttner M & Rziha HJ (2002). Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J. Vet. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 49: 7-16
11. Rziha H *et al.* (1999). Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *J. Biotechnol.* 73: 235-242
12. Rziha H *et al.* (2016). Generation and Selection of Orf Virus (ORFV) Recombinants. *methods Mol. Biol.* 1349: 177-200
13. Rziha H *et al.* (2019). Genomic Characterization of Orf Virus Strain D1701-V (Parapoxvirus) and Development of Novel Sites for Multiple Transgene Expression. *Viruses* 11:127
14. Amann R *et al.* (2013). A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 87: 1618-1630
15. Fischer T *et al.* (2003). Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *J. Virol.* 77: 9312-9323
16. Friebe A *et al.* (2011). Characterization of immunostimulatory components of orf virus (parapoxvirus ovis). *J. Gen. Virol.* 92: 1571-1584
17. Dory D *et al.* (2006). Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). *Vaccine.* 24: 6256-6263
18. Voigt H *et al.* (2007). Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* 25: 5915-5926
19. Van Rooij EMA *et al.* (2010). Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *vaccine* 28: 1808-1813
20. Rohde J *et al.* (2011). A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Vaccine.* 29: 9256-9264
21. Henkel M *et al.* (2005). Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J. Virol.* 79: 314-325
22. Rohde J *et al.* (2013). New Orf virus (Parapoxvirus) recombinant expressing H5 hemagglutinin protects mice against H5N1 and H1N1 influenza A virus. *PLoS one* 8: e83802
23. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
24. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht:21 oktober 2020)