

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

DATUM 05 november 2020
KENMERK CGM/201105-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met flavivirus en alphavirus chimeren

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'Productie van - en infectie met chimere virussen in animale cellen (III)' (IG 20-208_III-000), ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met verschillende flavivirus en aphavirus chimeren. De aanvrager is voornemens deze chimere virussen te produceren in dierlijke cellen, om hiermee vervolgens cellen te infecteren. De chimeren bestaan uit combinaties van het *Zika virus* (ZIKV) en het *Usutu virus* (USUV), het *West Nile virus* (WNV) en USUV, en de vaccinstam VEEV TC-83 van het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en het *Chikungunya virus* (CHIKV).

De chimeren zullen bestaan uit een combinatie van een klasse 3 (ZIKV, WNV, CHIKV) en een klasse 2 pathogeen (USUV, VEEV TC-83). De COGEM is van oordeel dat deze chimeren niet meer pathogeen of virulent zullen zijn dan de betreffende oudervirussen. Ook is het aannemelijk dat de uitwisseling van genen tussen de virussen zal resulteren in een verzwakking van het chimere virus. Echter, omdat dit niet met experimentele gegevens onderbouwd kan worden, gaat de COGEM in haar overwegingen ervan uit dat de betreffende chimeren gelijk zijn aan de betreffende uitgangsvirussen wat betreft pathogeniteit, gastheerbereik, transmissie en virulentie.

Alles in overweging nemende kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, onder navolging van de voorgestelde voorschriften, 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden prof. dr. J. Kortekaas en dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van productie- en infectiewerkzaamheden met verschillende flavivirus en alphavirus chimere

COGEM advies CGM/201105-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met verschillende flavivirus en alphavirus chimere (IG 20-208). De aanvrager, Wageningen Universiteit, is voornemens de chimere virussen te produceren in animale cellen, en vervolgens animale cellen te infecteren met deze chimere. De chimere bestaan uit combinaties van het *Zika virus* (ZIKV) en het *Usutu virus* (USUV), het *West Nile virus* (WNV) en USUV, en het *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) en het *Chikungunya virus* (CHIKV). In het geval van VEEV wordt er gebruik gemaakt van de VEEV TC-83 vaccinstam. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau III.

2. Flavivirussen – WNV, ZIKV, USUV

Flavivirussen zijn arbovirussen en behoren tot de familie van de *Flaviviridae*.¹ Deze virussen kunnen via muggen (met name *Culex* spp. of *Aedes* spp.) en andere bloedzuigende geleedpotigen (o.a. teken) worden overgedragen. Het genus *Flavivirus* bevat soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij mens of dier. Binnen het geslacht *Flavivirus* zijn 53 virussen ondergebracht.¹ De soorten met de grootste wereldwijde gezondheidsimplicaties voor de mens zijn WNV, *Yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Dengue virus* (DENV), ZIKV en *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV).^{2,3} Met uitzondering van TBEV (overgedragen door teken), worden WNV, YFV, JEV, DENV, ZIKV en USUV via muggen overgedragen naar de mens.

Infecties met WNV en ZIKV verlopen veelal asymptomatisch, maar in sommige gevallen kan infectie resulteren in zeer ernstige gezondheidsproblemen en sterfte. WNV is een virus dat circuleert in vogels. Het virus kan echter ook mensen, andere zoogdieren (o.a. paarden), amfibieën en reptielen infecteren.⁴ ZIKV is oorspronkelijk geïsoleerd uit non-humane primaten.⁵ Zowel WNV als ZIKV kunnen soms bij mensen neurologische problemen veroorzaken, zoals meningitis of encephalitis.^{6,7} In zeldzame gevallen kan een ZIKV-infectie het Guillain Barré Syndroom veroorzaken, een neuromusculaire verlamming die ontstaat doordat het afweersysteem het zenuwstelsel aanvalt.^{8,9,10} In het geval van ZIKV kan infectie gedurende de zwangerschap (met name in het eerste of tweede trimester) voor ernstige neurologische problemen (onder andere microcefalie) zorgen bij het ongebooren kind.^{7,10}

USUV veroorzaakt voornamelijk ziekte en sterfte onder vogels (met name merels, *Turdus merula*).¹¹ Indien mensen met een onderliggend ziektebeeld geïnfecteerd worden, kunnen in zeldzame gevallen neurologische aandoeningen ontstaan.¹²

Directe transmissie van mens naar mens (zonder tussenkomst van muggen) is zeldzaam, maar voor sommige flavivirussen wel gerapporteerd bij bijvoorbeeld orgaantransplantatie of bloedtransfusie. WNV kan in zeldzame gevallen tussen mensen overgedragen worden via moedermelk of

transplacentaal (van moeder naar kind). Ook is transmissie naar laboratoriummedewerkers gerapporteerd.¹³ Voor ZIKV kan overdracht van moeder op kind optreden tijdens de zwangerschap of rondom de bevalling. Daarnaast is ZIKV ook als enige flavivirus seksueel overdraagbaar.^{14,15}

Flavivirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kb, en zijn omhuld door een membraan.^{16,17} Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne,¹⁸ dat aan weerszijden wordt geflankeerd door een ‘untranslated region’ (UTR). Door splitsing van het polyproteïne worden drie structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.^{3,17} Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn oppervlakte-eiwitten, die betrokken zijn bij de binding van het virus aan de cellulaire receptor, de fusie van het virale membraan (de ‘envelop’) met het membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.¹⁹ De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA replicatie en de verwerking van het polyproteïne.²⁰ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij budding via het ER-membraan optreedt.²¹

3. Alphavirussen – CHIKV, VEEV

Alphavirussen behoren tot de familie *Togaviridae*,^{22,23} en hebben een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten.²⁴ Eender aan flavivirussen kunnen ook alphavirussen verspreid worden via insecten (met name muggen uit de genera *Aedes* of *Culex*).^{22,25} Het genus *Alphavirus* kent 31 species,¹ waaronder verscheidene soorten die gezondheidsimplicaties hebben voor mens en/of dier, zoals CHIKV, *Ross River virus* (RRV), *Sindbis virus* (SINV) en VEEV.²⁶

CHIKV veroorzaakt bij de mens een ernstige ziekte (chikungunya) die niet levensbedreigend is. Symptomen zijn onder meer hoge koorts, ernstige gewrichtspijn, huiduitslag en ooginfecties.^{22,27} Infectie is vaak zelflimiterend, maar sommige patiënten kunnen maanden of zelfs jaren last ondervinden van hun gewrichten.²²

VEEV kan een milde tot ernstige ziekte veroorzaken in paarden, variërend van koorts tot ernstige encefalitis. VEEV kan ook ziekte veroorzaken bij de mens. Bij volwassenen leidt een infectie doorgaans tot ziekteverschijnselen als koorts, hoofdpijn, spierpijn en keelontsteking. In jonge kinderen kan een infectie leiden tot hersenontsteking (encefalitis),^{28,29} met soms blijvende neurologische problemen. Bij zwangere vrouwen kan een infectie leiden tot foetale afwijkingen en miskramen.²⁸ Van VEEV is een levend verzwakt vaccin ontwikkeld: TC-83. Hier wordt in paragraaf 3.1 verder op ingegaan.

Bij VEEV zijn er gevallen beschreven waarbij onder laboratoriumomstandigheden aërogene verspreiding heeft plaatsgevonden.³⁰ Het is onduidelijk in hoeverre aërogene verspreiding onder natuurlijke omstandigheden een rol speelt. Bij werkzaamheden met grote hoeveelheden van CHIKV (grootschalige productie, celkweek) kan aerogene transmissie niet worden uitgesloten.³¹ Er is verschillende malen melding gemaakt van laboratoriuminfecties veroorzaakt door CHIKV.³²

Alphavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA genoom van 9,7 tot 11,8 kb.²³ De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden gecodeerd door genen in de 5' regio van het genoom en zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.³³ In de 3' regio liggen de genen die coderen voor de structurele eiwitten (C, E1 en E2).²² Het RNA wordt omgeven door een eiwitmantel, gevormd door het capsid eiwit (C). Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan waarin zich de glycoproteïnen (E1 en E2) bevinden die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheer cel. De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.²³

3.1 *Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) vaccinstam TC-83*

Er is op dit moment één levend verzwakt VEEV vaccin beschikbaar, genaamd TC-83, dat toegelaten is als veterinair vaccin door de Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA).³⁴ Deze vaccinstam wordt ook onder een 'Investigational New Drug protocol' van de FDA toegediend aan laboratorium- en veldmedewerkers die het risico lopen om geïnfecteerd te worden met een virulente stam van VEEV.³⁵

Het vaccin is geproduceerd door de virulente stam *Trinidad donkey* 83 keer te passeren in hartcellen van cavia's. Het geattenueerde virus is op 11 plaatsen gemuteerd in het virale genoom.^{36,37} De verzwakking van het gemuteerde virus berust op 2 van deze 11 mutaties, namelijk nucleotide positie 3 in de 5' non-coding regio en de mutatie van een nucleotide dat resulteert in de verandering van het aminozuur threonine naar arginine op positie 120, gelegen in structureel eiwit E2.^{37,38} Reversie naar wildtype VEEV is niet uitgesloten.³⁹

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens tien verschillende chimere virussen te produceren, waarbij combinaties gemaakt zullen worden tussen USUV en ZIKV (zes chimeren), USUV en WNV (drie chimeren), en één chimeer van VEEV TC-83 met CHIKV. Het betreft de onderlinge uitwisseling van niet-structurele en structurele genen tussen steeds twee virussen, in wisselende combinaties.

Voor de flavivirus-chimeren (USUV/ZIKV en USUV/WNV) wordt gebruik gemaakt van de CPER methode, waarbij het virale genoom samengesteld wordt uit verschillende PCR-producten door overlappende fragmenten te fuseren. Dit leidt tot een circulair DNA-molecuul (plasmide), dat naar cellen wordt getransfecteerd, waarna het virale RNA vanaf een promotor op het DNA-product tot expressie wordt gebracht en de chimere virussen geproduceerd worden.

De alphavirus-chimeer wordt vervaardigd door de structurele genen van CHIKV in de 'multiple cloning site' van een VEEV TC-83 replicon te kloneren. Deze chimeer bevat daardoor de structurele genen, de 26S promotor en de 5' en 3' UTR-sequenties van VEEV TC-83 en de structurele genen van CHIKV. De flavivirus-chimeren zullen worden gebruikt om het effect van de verschillende genen op de infectiositeit van de virussen te testen. De alphavirus-chimeer zal fungeren als positieve controle voor experimenten waarin recombinatie-evenementen tussen VEEV repliconvectoren en wildtype alphavirussen bestudeerd worden.

De aanvrager verzoekt om de productie van deze chimere virussen en de infectie van animale cellen met deze virussen uit te voeren op ML-III inperkingsniveau met inbegrip van aanvullende voorschriften:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt;
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan werkzaamheden met chimeren die een ZIKV component bevatten.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft de flavivirussen WNV⁴⁰ en ZIKV⁴¹ ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. USUV is in 2018 door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁴² Uit het genus *Alphavirus* heeft zij CHIKV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3,⁴³ en VEEV TC-83 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁴⁴

6. Overweging en advies

De aanvrager is voornemens tien verschillende flavivirus- en alphavirus-chimeren te produceren (zes USUV/ZIKV combinaties, drie USUV/WNV combinaties, en één VEEV TC-83/CHIKV-chimeer), en hiermee verschillende animale cellen te infecteren. De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van deze productie- en infectiewerkzaamheden. De aanvrager geeft aan dat de virale donorsequenties in combinatie met de te gebruiken virale vectoren zullen leiden tot de productie van chimere virus. In alle gevallen gaat het om chimeren afgeleid van een klasse 2 en een klasse 3 pathogeen.

Voor elk type chimeer heeft de aanvrager een risicobeoordeling aangeleverd. De aanvrager geeft daarbij aan dat verwacht wordt dat het tropisme en gastheerbereik, en de transmissie van de USUV/ZIKV en de USUV/WNV chimeren vergelijkbaar zullen zijn aan de wildtype virussen waaruit de chimeren zijn samengesteld. De aanvrager verwacht dat de pathogeniteit en virulentie van de USUV/ZIKV chimeren gelijk of minder zullen zijn dan die van wildtype ZIKV. Eveneens verwacht de aanvrager dat de chimere USUV/WNV virussen gelijk of minder pathogeen en virulent zullen zijn dan wildtype WNV. Voor de VEEV/CHIKV chimeer stelt de aanvrager dat het tropisme niet veranderd is in vergelijking met wildtype CHIKV. De chimeer kan zoogdieren en muggen infecteren, en zal kunnen worden verspreid door muggen die voeden op mensen en andere zoogdieren. Volgens de aanvrager is de chimeer verzwakt in celkweek en in muizen ten opzichte van wildtype CHIKV en VEEV TC-83, en worden er minder hoge virustiters geproduceerd in celkweek. De aanvrager levert wetenschappelijke literatuur om dit te ondersteunen.^{45,46}

Er zullen chimeren worden gemaakt die combinaties bevatten van een klasse 2 met een klasse 3 pathogeen. De COGEM is van oordeel dat de te produceren chimeren niet meer pathogeen of virulent zullen zijn dan de betreffende oudervirussen. Het is daarnaast aannemelijk dat uitwisseling van de genen tussen de virussen zal leiden tot attenuatie van de betreffende chimeren. Echter aangezien dit niet met experimentele gegevens onderbouwd kan worden, gaat de COGEM in haar overwegingen

ervan uit dat de betreffende chimeren gelijk zijn aan de betreffende uitgangsvirussen op het gebied van pathogeniteit, gastheerbereik, transmissie en virulentie..

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III en de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse II;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt;
- Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan werkzaamheden met chimeren die een ZIKV component bevatten.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III, onder navolging van de voorgestelde voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 28 januari 2020)
2. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
3. Laureti M *et al.* (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front. Immunol.* 9: 2180
4. Chancey C *et al.* (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int.* Article ID 376230. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376230>
5. Gutierrez-Bugallo G *et al.* (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nature Ecology & Evolution*, 3: 561-569
6. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2018). <https://www.rivm.nl/arbovirussen> (bezoekt: 16 juli 2019)
7. Best SM (2016). Flaviviruses. *Curr. Biol.* 26: R1258-R1260
8. Oehler E *et al.* (2014). *Zika virus* infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. www.eurosurveillance.org
9. Cao-Lormeau V-M *et al.* (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with *Zika virus* infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
10. Miner JJ & Diamond MS (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe.* 21: 134-142
11. Ashraf U *et al.* (2015). *Usutu virus*: an emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* 7: 219-238
12. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van het *Usutu virus*. (CGM/180827-01)
13. World Health Organization (WHO, 2017). West Nile virus Key facts. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus> (bezoekt: 27 oktober 2020)

14. World Health Organization (WHO, 2017). Zika virus Key facts <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> (bezocht: 27 oktober 2020)
15. Sakkas H *et al.* (2018). An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens* 7: 66
16. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
17. Simmonds P *et al.* (2017). ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 98: 2-3
18. Matsuda M *et al.* (2018). High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci. Rep.* 8: 16624
19. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
20. Simmonds P *et al.* (2012). Part II – The positive sense single stranded RNA viruses: Genus *Flavivirus*. In: *Virus Taxonomy*, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
21. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. *Flaviviridae*. In: *Fields Virology*. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
22. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: *Fields virology*, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
23. Powers A *et al.* (2012). Family *Togaviridae*. In *Virus taxonomy*, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
24. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant *Semliki Forest virus* Particles. *J. Virol.* 73: 1092–1098
25. Pialoux G *et al.* (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* 7: 319-327
26. Pietilä MK *et al.* (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234: 44-57
27. Mahendradas P *et al.* (2013). Chikungunya and the eye: a review. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* 3: 35-44
28. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.
29. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
30. Paessler S & Weaver SC (2009). Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27: D80–D85
31. Public Health Agency of Canada (2010). *Chikungunya virus* pathogen safety data sheet – infectious substances. www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/chikungunya-eng.php (bezocht 26 januari 2016)
32. Centers of Disease Control (2015). In: *CDC Health Information for International Travel*, Chapter 3, Chikungunya. www.nc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya (bezocht: 4 februari 2016)
33. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
34. Guerbois *et al.* (2013). IRES-driven expression of the capsid protein of the Venezuelan equine encephalitis virus TC-83 vaccine strain increases its attenuation and safety. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9; 7: e2197

35. Grabenstein JD *et al.* (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol. Rev.* 28: 3-26
36. Kinney RM *et al.*, (1989). The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83. *Virology* 170: 19-30
37. Kinney RM *et al.* (1993). Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 1269-1277
38. Kulasegaran-Shylini R *et al.* (2009). The 5'UTR-specific mutation in VEEV TC-83 genome has a strong effect on RNA replication and subgenomic RNA synthesis, but not on translation of the encoded proteins. *Virology* 387: 211-221
39. Kenney JL *et al.* (2011). Stability of RNA Virus Attenuation Approaches. *Vaccine* 29:2230-2234
40. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
41. COGEM (2016). Classificatie van en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Zika virus*. COGEM advies CGM/160307-01
42. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van het *Usutu virus*. COGEM advies CGM/180827-01
43. COGEM (2010). Classificatie van het *Chikungunya virus*. COGEM advies CGM/100404-08
44. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van *Venezuelan equine encephalitis virus* vaccinstam TC-83. COGEM advies CGM/170328-05
45. Wang E *et al.* (2008). Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 6: 5030-5039
46. Kim DY *et al.* (2011). Design of chimeric alphaviruses with a programmed, attenuated, cell type-restricted phenotype. *J. Virol.* 85: 4363-4376