

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J.J. Atsma  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 21 september 2011  
**KENMERK** CGM/110921-03  
**ONDERWERP** Advies: classificatie en werkzaamheden rLCMV

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag met de titel 'Onderzoek naar de genen coderend voor signaalmoleculen, membraanmoleculen en uitgescheiden factoren, die deling, overleving, differentiatie of migratie van immuuncellen reguleren' van de Stichting Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van en werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV). De aanvrager wil met de voorgenomen werkzaamheden de kinetiek van de antigeenspecifieke immunorespons bestuderen. LCMV is een enzoïtisch virus met als natuurlijke gastheer de muis. Het virus komt wereldwijd voor en muizen zijn vaak persistent geïnfecteerd met LCMV, waardoor zij het virus gedurende hun hele leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen. Infecties van knaagdieren naar de mens komen regelmatig voor waarbij de symptomen kunnen variëren van mild tot ernstig. LCMV kan leiden tot meningitis (hersenvliesontsteking). Mortaliteit van LCMV bij mensen is laag (<1%). Er zijn geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens wordt overgedragen, anders dan middels orgaantransplantatie en door verticale transmissie van moeder op foetus. In het laatste geval bestaat de kans op abortus, neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen. Er bestaat geen effectief vaccin of profylaxe voor LCMV.

Op basis van de ernst en aard van de ziekte, verspreiding en het ontbreken van een effectief vaccin of profylaxe tegen LCMV classificeert de COGEM LCMV in pathogeniteitsklasse 3. De aanvrager is voornemens wildtype en gg- muizen te infecteren met een recombinant LCMV. Dit gg-LCMV is volgens de aanvrager geattenuëerd ten opzichte van het wildtype virus. Op basis van de aangeleverde literatuur is de COGEM van mening dat de aanvrager deze attenuatie onvoldoende heeft onderbouwd. Hieruit vloeit voort dat werkzaamheden met gg-LCMV moeten worden uitgevoerd op ML-III / DM-III niveau. Bij genoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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 large loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

# Classificatie en inschaling van werkzaamheden met *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV)

## COGEM advies CGM/110921-03

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse het *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) LCMV. De aanvraag betreft een wijziging van een bestaande vergunning IG 98-146 met als titel “Onderzoek naar de genen coderend voor signaalmoleculen, membraanmoleculen en uitgescheiden factoren, die deling, overleving, differentiatie of migratie van immuuncellen reguleren” van de Stichting Nederlands Kanker Instituut. De aanvrager wil een infectiemodel toevoegen aan de vergunning waarbij wildtype en gg-muizen worden geïnfecteerd met gg-LCMV met een ingebouwd fluorescentiegen en het Ovalbumine-Antigen.

#### 1.1 *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV)

Het *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) is een enkelstrengs (-) RNA virus dat behoort tot de familie van de *Arenaviridae*, genus *Arenavirus*. Het genus *Arenavirus* bevat achttien soorten die veelal infectieus zijn voor knaagdieren, maar ook mensen kunnen infecteren. Andere virussen uit het genus *Arenavirus* zijn bijvoorbeeld het *Lassa virus* en Argentijnse, Boliviaanse en Venezuelaanse haemorrhagische koortsvirus.<sup>1</sup>

De natuurlijke gastheer van LCMV is de muis (*Mus musculus*), maar infecties bij andere knaagdieren zoals hamsters, ratten, konijnen en cavia's komen eveneens voor. LCMV kan daarnaast mensen, apen, honden en kippen infecteren. Bij muizen komt LCMV in de natuur meestal voor als persistente infectie (zgn. “carrier state”) waarbij de muizen het virus gedurende hun leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen zonder dat zij zelf ziektesymptomen hebben.<sup>2,3,4</sup> LCMV is niet vectoroverdraagbaar.<sup>5</sup> LCMV is enzoötisch in Europa, Afrika, de Verenigde Staten en mogelijk ook op andere continenten.

LCMV heeft zoönotisch potentieel. Mensen kunnen besmet raken met het virus door contact met besmette knaagdieren (besmette aërosolen, lichaamsvloeistoffen en faeces). Er zijn geen aanwijzingen voor mens op mens overdracht van LCMV, behalve door orgaantransplantatie van een besmette donor of door verticale transmissie van moeder op foetus.<sup>6</sup> Infecties van dier op mens komen regelmatig voor maar de incidentie is moeilijk in te schatten omdat de symptomen niet altijd opgemerkt worden. Op basis van onderzoek wordt geschat dat 5% van de mensen ooit een LCMV infectie heeft doorgemaakt.<sup>7</sup> Een derde van de infecties verloopt subklinisch, een derde met milde griepachtige verschijnselen en een derde van de infecties ontwikkelt zich met meer ernstige ziekteverschijnselen zoals meningitis (hersenvliesontsteking) of

meningoencephalitis (hersenen hersenvliesontsteking).<sup>4</sup> Mortaliteit in gezonde immuuncompetente mensen is minder dan 1%. Ook in ernstige gevallen treedt volledig herstel op na een LCMV infectie.<sup>7</sup> Infecties van mensen met LCMV komen zowel in laboratoria als via huisdieren voor. Bij laboratoriumbesmettingen betreft het in de meeste gevallen besmetting van medewerkers via proefdieren of animale cellijnen die reeds besmet zijn met wildtype LCMV.<sup>3</sup> Daarnaast komen besmettingen voor via knaagdieren die als huisdier gehouden worden. LCMV wordt verspreid via inhalatie van infectieuze virusdeeltjes uit (bijv. urine en faeces van) LCMV geïnfekteerde knaagdieren en via infectie van slijmvliezen of beschadigde huid.

Bij immuungecompromitteerde mensen kan een LCMV infectie ernstige en soms fatale gevolgen hebben. Dit komt bijvoorbeeld voor bij patiënten die een met LCMV besmet donorgaan ontvangen.<sup>8</sup> Daarnaast kan verticale transmissie optreden bij zwangere vrouwen waarbij de kans bestaat op abortus, neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen. Verticale transmissie van moeder op foetus is in 35% van de gevallen fataal voor het ongeboren kind.<sup>3</sup>

Er is geen vaccin of specifieke profylaxe voor LCMV beschikbaar. Antivirale middelen kunnen arenavirus-vermenigvuldiging *in vitro* remmen en zijn naar verwachting effectief om de symptomen te bestrijden.<sup>7</sup>

### ***1.2 Genomische organisatie van LCMV***

LCMV is een membraanbevattend enkelstrengs RNA virus. Het genoom bestaat uit twee ambisense RNA moleculen, een zogenaamd klein (S) en een groot (L) RNA segment. Het S segment codeert voor het nucleoproteïne (NP) en een glycoproteïne (GPC) dat later gesplitst wordt (GP1 en GP2). Het L segment codeert voor het virus polymerase (L) en de matrixeiwitten (Z). Doordat het genoom ambisense is, codeert niet alleen het genomische RNA (vRNA) maar ook het tijdens de replicatie gevormde complementaire RNA (vcRNA) voor eiwit.<sup>1</sup>

### ***1.3 Classificatie***

In de recentelijk geüpdate veiligheidsbeoordeling van de Canadese Public Health Agency wordt LCMV als soort ingedeeld in klasse 3 (september 2011). Opgemerkt wordt dat deze classificatie niet per se geldt voor alle LCMV stammen en isolaten.<sup>3</sup> Op internationaal niveau, zoals in verschillende Europese landen, de VS, Australië / Nieuw Zeeland en door de National Institutes of Health, wordt in veel gevallen een onderscheid gemaakt tussen niet-neurotrope en laboratoriumgeadapteerde LCMV stammen (ingedeeld in PG-2) en neurotrope LCMV stammen (ingedeeld in PG-3).<sup>9</sup> De neurotrope stammen hebben een specifiek tropisme voor het centrale zenuwstelsel en infecties met dergelijke stammen zijn over het algemeen ernstiger dan infecties met niet-neurotrope en laboratoriumstammen van LCMV. Als dierpathogeen wordt LCMV in België als klasse 2 aangemerkt.<sup>10</sup>

## **2. Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager wil de kinetiek van antigeenspecifieke immuunresponsen onderzoeken door gebruik te maken van een LCMV infectiemodel waarbij wildtype en gg-muizen worden geïnfecteerd met gg-LCMV.

Het gg-LCMV dat de aanvrager wil gebruiken is gebaseerd op de Armstrong CA1371 stam. Deze stam wordt wereldwijd gebruikt als infectiemodel voor onderzoek naar de interactie van virussen met het immuunsysteem van de gastheer. Deze LCMV stam werd in 1933 geïsoleerd uit een patiënt die overleed aan hersen(vlies)ontsteking (*Encephalitis*).<sup>11</sup> Later onderzoek aan cerebrospinale vloeistof van patiënten met aseptische/virale meningitis (hersenvliesontsteking) bevestigde dat LCMV een veel voorkomende oorzaak was van deze ziekte. Hieruit kan worden afgeleid dat de Armstrong stam van oorsprong een neurotrope LCMV variant is. Dit wordt bevestigd door onderzoek in muizen. Infectie met de Armstrong stam veroorzaakt bij muizen neurologische verschijnselen.<sup>12</sup>

De aanvrager is voornemens in de VS een recombinant versie van het Armstrong infectiemodel te laten maken. Het betreft een rLCMV die het Ovalbumine-Antigen (OVA) en het fluorescerend eiwit Katushka (Red Fluorescent Protein afkomstig van rode zeeanemoon) bevat. De methodiek voor vervaardiging van deze variant is beschreven in aangeleverde literatuur.<sup>12</sup> In deze publicatie wordt de ontwikkeling van een recombinante Armstrong stam (r3LCMV GFP/CAT stam) beschreven die een fluorescentie eiwit (GFP) en chloramphenicol acetyltransferase (CAT) tot expressie brengt. De aanvrager wil in plaats van GFP het fluorescentie gen Katushka inbouwen en in plaats van CAT het OVA-antigen.

De r3LCMV GFP/CAT stam is volgens de aanvrager geattenuëerd en heeft een verlaagde fitness en neurovirulentie ten opzichte van wildtype LCMV. Het precieze mechanisme voor deze attenuatie is nog niet opgehelderd. De r3LCMV GFP/CAT stam veroorzaakt in muizen echter nog steeds lethale infectie (37%) na intracerebrale inoculatie.<sup>12</sup> Dit is minder dan bij het wildtype LCMV (100% lethaal). Bij een hogere dosis was ook de r3LCMV GFP/CAT stam 100% lethaal. Verder blijkt de rLCMV stam nog steeds een tropisme te hebben voor CNS cellen, maar met verminderde spreiding en klinische expressie. Gegevens over intraveneuze inoculatie met deze stam zijn niet bekend.

Deze gegeven lijken in tegenspraak te zijn met andere overlegde gegevens door de aanvrager. De aanvrager verwijst voor de onderbouwing van de attenuatie tevens naar een ander onderzoek met muizen die na intraveneuze infectie met LCMV Armstrong overleven en het virus binnen 8 tot 10 dagen opruimen.<sup>2</sup> Echter, data worden niet getoond. In dit artikel wordt tevens geconcludeerd dat inoculatie van pasgeboren muizen met LCMV Armstrong resulteert in persistent geïnfecteerde dieren zonder mortaliteit. Dit zou mogelijk wijzen op een niet-neurovirulent of in elk geval verzwakt neurovirulent karakter van deze stam.

De aanvrager is voornemens de volgende handelingen uit te voeren met het gg-LCMV CAT/OVA:

- Infectie van animale cellen (BHK21, L929 en Vero E6 cellen) met gg-LCMV en handelingen met deze cellen
- Handelingen met wildtype en gg-muizen in associatie met gg-LCMV
- Handelingen met cellen en weefsels van deze muizen

### 3. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van LCMV evenals over de beschreven werkzaamheden van gg-LCMV in associatie met dieren en dierencellijnen.

#### 3.1 Classificatie van LCMV

Op internationaal niveau wordt in veel gevallen een onderscheid gemaakt tussen de neurotrope en de niet-neurotrope variant van LCMV. De neurotrope variant en soms de gehele soort LCMV wordt ingedeeld in klasse 3. Niet neurotrope stammen en laboratorium geadapteerde stammen worden internationaal doorgaans ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Bij deze indelingen worden echter geen specifieke stammen genoemd.

In Nederland wordt de pathogeniteit van micro-organismen bepaald op basis van de aard van de ziekte, de verspreiding onder de bevolking en de aanwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling (Regeling genetisch gemodificeerde organismen). In de voormalige Appendix A van de regeling GGO is LCMV ingedeeld als klasse 2 pathogeen.<sup>13</sup> Pathogene organismen in deze klasse kunnen ziekte veroorzaken bij mensen en/of dieren maar het is onwaarschijnlijk dat deze zich verder zal verspreiden in de populatie. Een adequate profylaxe of therapie is voorhanden.

LCMV is van oorsprong een dierpathogeen dat bij muizen een persistente infectie veroorzaakt zonder ziekteverschijnselen waardoor deze muizen gedurende hun leven een bron van infectie vormen. Het virus heeft zoönotisch potentieel en kan ziekte veroorzaken in de mens. LCMV wordt overgedragen door contact met uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen van geïnfecteerde muizen en enkele andere knaagdieren. Besmetting dier op mens kan gemakkelijk plaatsvinden en komt regelmatig voor door contact met besmette (huis)dieren of via laboratoriuminfecties met besmette proefdieren of cellijnen. Ziektesymptomen variëren van mild en subklinisch tot ernstig waarbij hersenvliesontsteking kan ontstaan. De mortaliteit van LCMV is laag (<1%). Met uitzondering van verticale transmissie zijn er geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen. De gevolgen van infectie door verticale transmissie kunnen ernstig (neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen) of zelfs fataal (35%) zijn voor het ongeboren kind. Er bestaat geen vaccin of specifieke behandeling voor LCMV infecties.

Geconcludeerd kan worden dat hoewel LCMV een lage mortaliteit kent, het virus gemakkelijk kan worden overgedragen van dier op mens en een infectie tot ernstige ziekte kan leiden. De gevolgen voor het ongeboren kind bij een eventuele infectie van zwangere vrouwen kunnen ernstig of zelfs fataal zijn en er is geen effectief vaccin of profylaxe voorhanden. Op basis hiervan adviseert de COGEM wildtype LCMV als een klasse 3 pathogeen te beschouwen. Dit is in overeenstemming met de internationale indeling van (neurotrope stammen van) LCMV.

#### **Recombinant LCMV**

De uitgangsstam (Armstrong) waarmee de aanvrager wil gaan werken is van oorsprong neuropathogeen. Deze stam wordt al geruime tijd gebruikt voor onderzoek, is inmiddels

veelvuldig gepasseerd in *in vitro* cel cultures en is een veel gebruikt infectiemodel voor onderzoek naar immunorespons.<sup>14, 15, 16</sup> De aanvrager geeft aan dat de te gebruiken gg-LCMV stam (gebaseerd op de Armstrong stam) geattenuëerd is t.o.v. wildtype LCMV en verwijst hiervoor naar enkele onderzoeken.<sup>2,12,17</sup> Het exacte mechanisme van attenuatie is echter nog niet opgehelderd en hoewel diverse artikelen aantonen dat de rLCMV stam een lagere fitness en virulentie heeft dan wildtype LCMV, veroorzaakt deze een ernstige ziekte bij muizen die in hogere doses een fatale afloop heeft. Uit dit onderzoek kan bovendien geconcludeerd worden dat de gg-LCMV stam nog steeds gedeeltelijk neuropathogeen is.

Over het algemeen zal genetische modificatie cq insertie van genen tot verzwakking van een virus leiden, zoals deels bevestigd lijkt te worden in het aangeleverde onderzoek. Gezien de neuropathogene aard en ernst van de ziekte, is de COGEM echter van mening dat attenuatie van het virus onvoldoende aangetoond is en dat resultaten verkregen in muizen niet zonder meer geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat een eventuele infectie van laboratoriummedewerkers met gg-LCMV of een infectie en ontsnapping van (proef)dieren mogelijk ernstige gevolgen kan hebben. Hieruit volgt dat de COGEM van mening is dat de op Armstrong gebaseerde gg-LCMV stam niet omlaag geschaald kan worden.

### **3.2 Inschaling van werkzaamheden met rLCMV**

De aanvrager is voornemens om zowel animale cellen als muizen te infecteren met rLCMV en handelingen uit te voeren met cellen en weefsels van deze dieren. Gezien het extra gezondheidsrisico (niet milieurisico) bij een eventuele besmetting van medewerkers die zwanger zijn of waarvan het immuunsysteem niet goed functioneert, adviseert de COGEM deze uit te sluiten van de voorgenomen werkzaamheden.

De aanvrager is voornemens om animale cellen te infecteren met gg-LCMV en handelingen met deze cellen uit te voeren. Op basis van de klasse 3 inschaling voor de te gebruiken rLCMV stam en de verspreidingsroute van LCMV, adviseert de COGEM deze werkzaamheden uit te voeren op ML-III niveau

Daarnaast wil de aanvrager zowel wildtype als gg-muizen infecteren met gg-LCMV en handelingen uitvoeren met cellen en weefsels van deze muizen. Op basis van de klasse 3 inschaling voor de te gebruiken rLCMV stam en de verspreiding van LCMV adviseert de COGEM deze werkzaamheden uit te voeren op DM-III/ML-III. Omdat besmetting met LCMV via aërogene deeltjes en beschadigde huid kan plaatsvinden, adviseert de COGEM tevens om het gebruik van sharps in associatie met de proefdieren zoveel mogelijk te beperken. De COGEM realiseert zich dat dit voor het inoculeren van de muizen onvermijdelijk is.

## **4. Conclusie**

LCMV is een zoönotisch pathogeen dat oorspronkelijk uit muizen komt en gemakkelijk kan worden overgedragen van dier op mens. Ziektesymptomen variëren van mild en subklinisch tot ernstig waarbij hersenvliesontsteking kan ontstaan. De mortaliteit van LCMV is laag (<1%). Met uitzondering van verticale transmissie zijn er geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens

kan worden overgedragen. De gevolgen van infectie door verticale transmissie kunnen echter ernstig (neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen) of zelfs fataal (35%) zijn voor het ongeboren kind. Er bestaat geen vaccin of specifieke behandeling voor LCMV infecties. Gezien de aard en verspreiding van de ziekte en de afwezigheid van effectieve profylaxe of behandeling acht de COGEM de indeling van LCMV in pathogeniteitsklasse 3 gerechtvaardigd.

Het gg-LCMV waarmee de aanvrager wil gaan werken is gebaseerd is op de LCMV laboratorium stam Armstrong, van oorsprong geïsoleerd uit een patiënt die overleed aan meningitis na een LCMV infectie. Hieruit kan worden afgeleid dat het gaat om een LCMV stam met neuropathogene kenmerken. De COGEM is van mening dat op basis van de aangeleverde informatie onvoldoende overtuigend wordt aangetoond dat de te gebruiken gg-LCMV significant geattenuëerd is. Hieruit vloeit voort dat voor werkzaamheden in associatie met animale cellen en met proefdieren met dit gg-LCMV een inschaling op DM-III / ML-III niveau gerechtvaardigd is. Bij bovenstaande inperkingniveau's en onder navolging van genoemde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van genoemde werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

## 5. Referenties

- <sup>1</sup> Buchmeier MJ, Bowen MD and Peters CJ (2001). Arenaviridae: The viruses and their replication, in Fields of Virology Vol 2, 4th edition, eds. Knipe DM and Howley PM.
- <sup>2</sup> Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM en Oldstone MBA (1984). Selection of Genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. J.Exp.Med 60; 521-540
- <sup>3</sup> Public Health Agency Canada (2011) Pathogen Safety Data Sheet – Infectious Substances. Internet: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/lymp-cho-eng.php> (21 september)
- <sup>4</sup> Barton LL, Mets MB (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. Clin Infect Dis 2001;33:370-4.
- <sup>5</sup> Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). In Pan American Health Organization (Ed.), Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals (3rd ed.). Washington DC: PAHO HQ library
- <sup>6</sup> Control of Communicable Diseases Manual: An Official Report of the American Public Health Association. (2004). In D. L. Heymann (Ed.), (18th ed., pp. pp. 321-322). Washington, D.C.: American Public Health Association). Uit: PSDS sheet Canada
- <sup>7</sup> Peters, C. J. (2006). Lymphocytic choriomeningitis virus - An old enemy up to new tricks. New England Journal of Medicine, 354(21), 2208-2211.
- <sup>8</sup> Fischer SA, Graham MB, Matthew MD et al (2006) Transmission of Lymphocytic Choriomeningitis Virus by Organ Transplantation. N.Engl.J.Med Vol. 354 no 21. May 2006
- <sup>9</sup> American Biological Safety Association (ABSA). Risk Group Classification for Infectious Agents. Internet: <http://www.absa.org/riskgroups/virusessearch.php?viralgroup=arenaviridae&name=> (21 september)



- <sup>10</sup> Belgian Biosafety Server. List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. Internet: [http://www.biosafety.be/PDF/2009\\_classification\\_lists/H\\_A\\_virus.pdf](http://www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf) (21 september)
- <sup>11</sup> Armstrong, C. & Lillie, R. D. (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Reports 49, 1019- 1027.
- <sup>12</sup> Emonet SF, Garidou L, McGavern DB en De la Torre JC (2009) Generation of Recombinant Lymphocytic Choriomeningitis viruses with trisegmented genomes stably expressing two additional genes of interest. PNAS, Vol.106 No9, 3473-3478
- <sup>13</sup> VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
- <sup>14</sup> Lehmann-Grube F, Peralta LM, Bruns, M and Lohler J (1983) Persistent infection of mice with the lymphocytic choriomeningitis virus. In Comprehensive Virology, H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, editors. Plenum Publishing Corp, New York.
- <sup>15</sup> Buchmeier MJ, Welsh RM, Dutko FJ and Oldstone MBA (1980) The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. Adv. Immunology.
- <sup>16</sup> Zinkernagel RM (2002) Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. Curr TopMicrobiol Immunol 263:1-5.
- <sup>17</sup> Popkin DL, Teijaro JR, Lee AM, et al (2011). Expanded potential for recombinant trisegmented lymphocytic choriomeningitis viruses: protein production, antibody production and In vivo assessment of biological function of genes of interest. J. of Vir. Vol. 85, 7928-7932