

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 september 2015
KENMERK CGM/150907-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met gg-CHIKV en gg-WNV in combinatie met muggen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag “Genetisch gemodificeerde virussen (WNV, CHIKV) met ‘loss of function’ puntmutaties” (IG15-194) van Wageningen University, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de inschaling van handelingen met genetisch gemodificeerd (gg-) Chikungunya virus (CHIKV) en gg-West Nile virus (WNV) in combinatie met muggen.

De aanvrager wil het effect van puntmutaties op de replicatie en infectie van CHIKV en WNV onderzoeken. Daartoe worden muggen door een bloedmaaltijd of door micro-injectie geïnfecteerd met gg-WNV en gg-CHIKV en wordt na incubatie de hoeveelheid virus in muggenspeeksel bepaald.

De aanvrager voert de werkzaamheden uit in een ML-III lab met daarin een muggenkamer en muggentent. De aanvrager heeft verschillende maatregelen genomen om ontsnapping van muggen te voorkomen. Naast de al genomen maatregelen adviseert de COGEM om de muggen voorafgaand aan en bij beëindiging van de werkzaamheden te tellen, zodat een eventuele ontsnapping tijdig opgemerkt wordt. Daarnaast moeten het haar, de baard en de snor (indien aanwezig) van de onderzoeker bedekt worden om te voorkomen dat een mug zich daarin verbergt en met de onderzoeker het ML-III lab kan verlaten. Ook is de COGEM van mening dat zowel in de muggentent, de muggenkamer, als het ML-III lab een spuitbus met insecticide aanwezig moet zijn om eventuele ontsnapte muggen te doden.

Omdat aerogene transmissie van CHIKV en WNV onder laboratoriumomstandigheden niet volledig uitgesloten kan worden, is de COGEM van mening dat in het algemeen open handelingen met gg-CHIKV en gg-WNV in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. De COGEM vindt dat in het geval van de beschreven werkzaamheden met gg-CHIKV en gg-WNV in de muggentent een veiligheidsbril en een neus/mondkapje (bijvoorbeeld een N95 kapje) voldoende inperking bieden.

Met de door de aanvrager genomen maatregelen en deze aanvullende voorschriften acht de COGEM het risico van de werkzaamheden met gg-WNV, gg-CHIKV in combinatie met muggen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling van werkzaamheden met gg-Chikungunya virus en gg-West Nile virus in combinatie met muggen

COGEM advies CGM/150907-02

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van de vergunningaanvraag “Genetisch gemodificeerde virussen (WNV, CHIKV) met ‘loss of function’ puntmutaties” (IG15-194) van Wageningen University gevraagd om te adviseren over de inschaling van handelingen met genetisch gemodificeerd (gg-) West Nile virus (WNV) en gg-Chikungunya virus (CHIKV) in combinatie met de Gewone steekmug (*Culex pipiens*) en de Gele koortsmug (*Aedes aegypti*).

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.¹ Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse.

2. Chikungunya virus (CHIKV)

Het Chikungunya virus behoort tot het genus *Alphavirus* binnen de familie van de *Togaviridae*.² Alphavirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van ongeveer 12 kb. Het genoom wordt ingepakt in een icosahedrische mantel die wordt omgeven door een lipidemembraan. De virusdeeltjes zijn 60 tot 70 nm groot.

Het *Alphavirus* genoom codeert voor negen eiwitten, waarvan vier niet-structurele en vijf structurele eiwitten. De niet-structurele eiwitten worden gecodeerd door het deel van het virale genoom dat aan het 5'-uiteinde ligt. De coderende sequentie voor deze eiwitten beslaat tweederde deel van het gehele genoom. Het resterende deel, aan het 3'-uiteinde, codeert voor de vijf structurele eiwitten.^{2,3} Op het RNA genoom is een zogenaamd ‘packaging’ signaal gelegen, dat noodzakelijk is om het genomisch RNA in te pakken in de eiwitmantel. De mantel wordt gevormd door het manteleiwit (C). Het lipidemembraan is afkomstig van de gastheercel en presenteert de twee virale glycoproteïnes (E1 en E2). De glycoproteïnes vormen een heterodimeer en zijn betrokken bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.

Symptomen en oorsprongsgebied

Binnen enkele dagen na een infectie met het CHIKV manifesteren zich de eerste klinische symptomen. De ziekte kenmerkt zich onder andere door plotselinge hoge koorts, huiduitslag en gewrichtspijn. Na enkele weken verdwijnt de infectie meestal, maar er zijn patiënten bekend die maanden of zelfs jaren last ondervinden van hun gewrichten.^{7,9}

CHIKV werd voor het eerst geïsoleerd in 1953 tijdens een uitbraak in Tanzania en heeft zich vanuit Afrika verspreid naar andere werelddelen. Al in de 17^{de} of 18^{de} eeuw heeft CHIKV zich

vanuit Afrika naar Noord- en Zuid Amerika verspreid en begin 19^{de} eeuw was CHIKV de veroorzaker van verschillende uitbraken in India.⁴

In de zomer van 2007 is er in Italië een uitbraak van CHIKV geweest. De bron van de uitbraak was vermoedelijk één besmette reiziger uit India. Er zijn in totaal 254 mensen ziek geworden, waarvan er elf in het ziekenhuis zijn opgenomen en één is overleden.⁵ De overleden patiënt was ernstig verzwakt door een andere aandoening. Over het algemeen is een infectie met CHIKV echter niet levensbedreigend.

Tot op heden is er geen specifieke antivirale behandeling tegen een infectie met het CHIKV. Ook is er geen vaccin beschikbaar tegen het CHIKV. Er worden wel enkele kandidaat-vaccins getest in klinische studies.^{9,6}

Vector

Alle 28 tot nu toe bekende *Alphavirussen* worden verspreid via insecten⁷ en behoren daarmee tot de zogenaamde arbovirussen (arthropodborne viruses). De Gele koortsmug (*Aedes aegypti*) is de primaire vector van CHIKV, maar andere *Aedes* muggen zoals de Aziatische tijgermug (*Aedes albopictus*) en ook enkele andere muggensoorten (*Opifex fuscus*, *Eretmapodites chrysogaster*) kunnen CHIKV overdragen.^{7,8,9} *O. fuscus* en *E. chrysogaster* komen niet in Nederland voor. Er zijn in Nederland wel verschillende inheemse muggen die tot het *Aedes* geslacht behoren.¹⁰ Van sommige van deze muggensoorten (*A. caspius*, *A. detritus*, *A. vexans*) is aangetoond dat zij met CHIKV geïnfecteerd kunnen worden.⁸

De Gele koortsmug kan zich in Nederland niet handhaven, maar wordt net als de Aziatische tijgermug incidenteel geïmporteerd in Nederland.^{11,12,13} De Aziatische tijgermug is waarschijnlijk wel in staat om de Nederlandse winters te overleven.¹⁴ In Nederland wordt het voorkomen van exotische muggen zoals de Gele koortsmug en de Aziatische tijgermug gemonitord en worden zij indien nodig bestreden.¹⁵

Reservoir en gastheerbereik

Naast de mens zijn ook apen, knaagdieren en vogels gastheren en reservoirs van dit virus. Bovendien kunnen vlermuizen een reservoir van dit virus zijn.¹⁶

3. West Nile virus (WNV)

Het West Nile virus behoort tot het genus *Flavivirus* binnen de familie van de *Flaviviridae*. *Flaviviridae* zijn positieve enkelstrengs RNA virussen met een genoom van ca. 11 kb. Tussen de niet-getransleerde regio's (UTRs) aan de 5' en 3' uiteinden van het genoom bevindt zich één open reading frame (ORF). Het polyproteïne wordt door proteases van zowel het virus als de gastheer omgezet in tien virale eiwitten. De drie structurele eiwitten (het capsid, het membraan en het envelopeiwit) bevinden zich in het N-terminale deel van het gevormde polyproteïne en de zeven niet-structurele eiwitten bevinden zich in het C-terminale deel van het polyproteïne.¹⁷

Reservoir en gastheerbereik

WNV is een virus dat circuleert in vogels. Het virus kan echter ook mensen, andere zoogdieren (o.a. paarden), amfibieën en reptielen infecteren.¹⁸ In met WNV geïnfekteerde mensen en paarden ontwikkelen zich te weinig virusdeeltjes om opnieuw muggen met WNV te infecteren.¹⁸

Oorsprongsgebied en verspreiding

WNV werd voor het eerst ontdekt in 1937 in Oeganda waarna het zich verspreid heeft en ook is aangetroffen in Zuid-Afrika, Egypte, Israël, India, Roemenië en Frankrijk. In de zomer van 1999 werd WNV geïntroduceerd in New York en zorgde daar voor een uitbraak van het virus. Inmiddels heeft het virus zich verspreid door de gehele Verenigde Staten, Canada en Mexico.¹⁸ Tussen 2008 en 2013 zijn er uitbraken geweest in Griekenland, Italië, Hongarije, Roemenië, Rusland en Servië.¹⁹

Symptomen

Het merendeel van de infecties (ca. 80%) verloopt asymptomatisch. In de resterende gevallen variëren de symptomen van griepachtige verschijnselen tot ernstige neuroinvasieve ziekten, zoals hersen(vlies)ontsteking. Minder dan 1% van de geïnfekteerde mensen wordt ernstig ziek. De gemiddelde leeftijd van patiënten die aan WNV overlijdt is 78, maar ook jongeren kunnen ernstig ziek worden door een infectie met WNV.¹⁸ Hoewel er wel een veterinair vaccin is voor WNV, is er voor mensen geen vaccin voor WNV op de markt. Op dit moment wordt een kandidaat-vaccin getest in een klinische studie.²⁰

Vectoren

WNV wordt overgebracht door muggen. Muggen die zowel vogels als mensen steken (zoals *Culex* spp. en *Aedes* spp.) zorgen ervoor dat het virus naar mensen wordt overgedragen. Een belangrijke vector van WNV, die ook in Nederland veel voorkomt,²¹ is de Gewone steekmug (*Culex pipiens*). WNV kan echter ook zonder tussenkomst van een mug overgedragen worden wanneer besmette dieren worden opgegeten of wanneer vogels in contact komen met lichaamsvocht (cloacaal of oraal) van besmette vogels.¹⁸

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft WNV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²² Zij heeft niet eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met dit virus.

Ook CHIKV is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²³ De COGEM heeft eerder wel geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-CHIKV. Zij adviseerde toen om de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met animale cellijnen, cellen en weefsels op ML-III niveau in te schalen, en kon instemmen met de inschaling van de voorgenomen kloneringswerkzaamheden op inperkingsniveau ML-II.²³ De COGEM adviseerde ook om bij *in vitro* werkzaamheden alle open handelingen in een veiligheidskabinet klasse-II uit te voeren omdat aerogene besmetting van medewerkers met gg-CHIKV niet uitgesloten kon worden.²³

5. Voorgenomen werkzaamheden:

Genetische modificatie van CHIKV en WNV

De aanvrager wil de hypothese testen dat bepaalde mutaties de replicatie van CHIKV en WNV in muggen verminderen. Hij is voornemens om bij CHIKV puntmutaties in de C-terminale L/ITFGDFD repeat regio's van het nonstructurele eiwit nsP3 aan te brengen. Deze repeat regio's zijn noodzakelijk voor binding aan het RasGAP SH3-domain binding protein (G3BP)²⁴ dat noodzakelijk is voor replicatie van CHIKV.²⁵ Bij WNV wil de aanvrager puntmutaties aanbrengen in de SL-II en SL-IV regio's van de niet-getransleerde regio (UTR) op het 3'uiteinde van het virale genoom. Deze regio's verstoren de afbraak van het virale genoom door exoribonucleases van de gastheer.²⁶

Handelingen met gg-CHIKV, gg-WNV en muggen

De aanvrager wil muggen (de Gewone steekmug en de Gele koortsmug) infecteren met genetisch gemodificeerd virus (gg-CHIKV en gg-WNV) om te onderzoeken of de aangebrachte puntmutaties replicatie en/of infectie van het virus verminderen. Het onderzoek met gg-CHIKV wordt uitgevoerd met de Gele koortsmug en het onderzoek met gg-WNV gebeurt met de Gewone steekmug.

Om te onderzoeken of er sprake is van verminderde replicatie en/of infectie worden de muggen op twee manieren geïnfecteerd met gg-virus.

De muggen worden geïnfecteerd door een zogenaamde 'Hemotek feeder' met daarin infectieus kippenbloed op een kooitje met muggen te plaatsen. De muggen kunnen dan door het gaas en het parafilm membraan van de 'Hemotek feeder' heen het bloed tot zich nemen.

Ook worden de muggen geïnfecteerd door injectie met gg-virus m.b.v. een Nanoject II. Hierbij worden de muggen verdoofd met CO₂ voordat het kooitje wordt geopend. De muggen liggen tijdens het injecteren van het gg-virus op een CO₂ pad om ervoor te zorgen dat de muggen verdoofd blijven.

Na de bloedmaaltijd of injectie worden de muggen 1 tot 2 weken in een klimaatkast geplaatst, waarna het speeksel van de muggen wordt verzameld om te bepalen hoeveel gg-virus erin aanwezig is. Dit gebeurt door de vleugels en pootjes van de muggen te verwijderen nadat deze met CO₂ verdoofd zijn. De muggen worden vervolgens met hun zuigsnuut ('proboscis') gedurende 45 minuten in het puntje van een pipet met een kleine hoeveelheid vloeistof geplaatst. De muggen worden hierna ingevroren.

De hoeveelheid gg-virus in het speeksel wordt bepaald m.b.v. een titratie assay in zoogdiercellen (GHK-21, HEK293 of VERO-E6) of insectencellen (C6/36, U4.4 of Culex tarsalis CT).

Faciliteiten

De aanvrager wil alle werkzaamheden uitvoeren in een ML-III lab dat voorzien is van een sluis (anteroom) en getrapte onderdruk. Het lab heeft een sluis met twee deuren. In zowel het ML-III lab als de sluis is een UV-muggenval aanwezig. De muggen worden gehouden in containers die met knuttengaas zijn afgedekt.

De *in vitro* werkzaamheden vinden plaats in een 'class IIA' veiligheidskabinet. Zodra er met muggen wordt gewerkt gebeuren de handelingen elders in het ML-III lab. De bloedmaaltijd wordt gegeven in de muggenkamer. Dit is een kubus van ongeveer 8 m³ die van de rest van het ML-III lab is afgesloten door een deur met een zelfsluitend magnetisch muggengordijn. Het sorteren van muggen die wel/geen bloedmaaltijd hebben genomen, het injecteren van de muggen en het oogsten van het muggenspeeksel gebeurt in een muggentent. Dit is een tent van knuttengaas die door een rits geopend kan worden.

De onderzoekers dragen klompen, sokken, een overall, schort en handschoenen. De kleding en klompen zijn wit. Bij werkzaamheden in het veiligheidskabinet worden een extra paar handschoenen en mouwtjes gedragen. Na de werkzaamheden worden kleding en klompen in de sluis achtergelaten.

6. Overweging

CHIKV en WNV zijn beide ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 en kunnen door muggen overgedragen worden. In CHIKV en WNV worden puntmutaties aangebracht waarvan verwacht wordt dat zij de virussen zullen atteneren en/of de replicatie van het virus zullen verminderen. Hoewel de gg-virussen waarschijnlijk minder virulent en in ieder geval niet virulenter zullen zijn dan wild-type CHIKV en WNV gaat de COGEM er bij haar risicoanalyse vanuit dat gg-CHIKV en gg-WNV even virulent zijn als de wild-type virussen, omdat het bewijs voor attenuatie nog niet is geleverd.

Als onderdeel van het onderzoek naar replicatie en infectie van de gg-virussen worden de Gele koortsmug en de Gewone steekmug geïnfecteerd met het gg-virus. Alle werkzaamheden worden uitgevoerd in een ML-III lab, dat zoals voorgeschreven is voorzien van een sluis met twee deuren en (getrapte) onderdruk. De lucht wordt afgevoerd via een HEPA filter en zowel in het ML-III lab als de sluis zijn UV-muggenvallen aanwezig.

De muggen worden gehouden in containers die zijn afgedekt met knuttengaas. Per container worden maximaal 50 muggen gehouden. Alleen wanneer dit nodig is voor het experiment, worden de muggen uit hun container gehaald. Dit gebeurt bij het sorteren van muggen, het injecteren van muggen met gg-virus en bij het verzamelen van muggenspeeksel. Voordat de muggen uit hun container worden gehaald, worden ze verdoofd met CO₂ waarna ze op een CO₂ pad worden geplaatst of hun poten en vleugels worden verwijderd. Tijdens de bovengenoemde werkzaamheden zou een mug uit de stroom met CO₂ kunnen geraken en ontwaken. De COGEM adviseert om het aantal muggen te tellen voordat deze uit hun container worden gehaald en om deze na beëindiging van de werkzaamheden opnieuw te tellen om te verifiëren dat er geen muggen zijn ontsnapt. Het tellen van de muggen draagt bij aan het tijdig opmerken van een ontwaakte mug, waardoor ook de kans dat de onderzoeker wordt gestoken, wordt geminimaliseerd.

De muggentent is altijd gesloten. Doordat de muggentent en het werkblad wit zijn en de onderzoekers witte kleding, sokken en klompen dragen wordt het opmerken van een eventueel ontsnapte mug vergemakkelijkt. Mocht er een mug ontsnappen dan wordt deze met een 'suction

tube' gevangen en als dat niet lukt wordt een spuitbus met insecticide gebruikt om de mug te doden. De onderzoeker mag de tent pas verlaten als een ontsnapte mug is gevangen of gedood.

In de procedures die door de aanvrager zijn aangeleverd, staat beschreven dat de onderzoeker een spuitbus met insecticide vanuit het ML-III lab de muggentent in moet meenemen, voordat hij met zijn werkzaamheden begint. De COGEM wijst op het belang dat in elke ruimte (muggentent, muggenkamer en ML-III lab) standaard een spuitbus met insecticide aanwezig is, zodat deze altijd onder handbereik is. Ook is de COGEM van mening dat het hoofdhaar van de onderzoeker, maar ook een eventuele baard of snor, door een haarkapje of iets vergelijkbaars bedekt zou moeten zijn, om te voorkomen dat een mug zich in het haar verbergt en met de onderzoeker meelift als deze het ML-III lab verlaat.

Omdat aerogene transmissie van CHIKV is gerapporteerd^{27,28} en er tijdens laboratoriumwerkzaamheden vaak met hoge concentraties CHIKV wordt gewerkt, heeft de COGEM eerder geadviseerd om open handelingen met gg-CHIKV in een veiligheidskabinet klasse-II uit te voeren.

Ook bij WNV zijn er aanwijzingen dat aerogene transmissie bij laboratoriumwerkzaamheden op zou kunnen treden.^{29,30} Daarom adviseert de COGEM open handelingen met gg-WNV in een veiligheidskabinet klasse-II uit te voeren.

In de voorliggende aanvraag wordt in een muggentent gewerkt met gg-CHIKV en gg-WNV. De aanvrager gaat verdoofde muggen m.b.v. een Nanoject II en een glazen naald injecteren met gg-WNV en gg-CHIKV. Het injecteren van muggen gebeurt onder gecontroleerde omstandigheden waardoor nauwelijks aerosolvorming optreedt. Ook bij het verzamelen van muggenspeeksel is vanwege de proefopzet, de kleine hoeveelheid vloeistof die wordt gebruikt en de mogelijke hoeveelheid virus in muggen, de kans op het vrijkomen van aerosolen gering. Hoewel de COGEM van mening is dat in het algemeen open handelingen met deze gg-virussen in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd zouden moeten worden, is zij van mening dat in dit geval door het dragen van een veiligheidsbril en mond/neuskapje (bijvoorbeeld een N95 kapje) het risico van aerogene overdracht van de gg-virussen voldoende wordt voorkomen.

7. Advies

De COGEM is van mening dat met de volgende aanvullende maatregelen de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn:

- Tellen van de muggen voor opening van de container en na terugplaatsing van de muggen;
- Bedekking van haar, baard en/of snor (indien aanwezig) met een haarkapje of iets vergelijkbaars;
- Standaard aanwezigheid van een spuitbus met insecticide in muggentent, muggenkamer en ML-III lab;
- Uitvoeren van open handelingen met gg-CHIKV en gg-WNV in een klasse II veiligheidskabinet;
- Dragen van een neus/mondkapje (bijvoorbeeld een N95 kapje) en een veiligheidsbril bij de beschreven open handelingen met gg-CHIKV en gg-WNV in de muggentent.

Referenties

1. Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013
2. Weaver SC *et al.* (2000). Family Togaviridae. In: Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. Van Regenmortel MHV *et al.*, Academic Press, San Diego.
3. Schlesinger S & Schlesinger MJ (2001). *Togaviridae*: The viruses and their replication. In: Fields Virology. Edited by: Knipe MD and Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Weaver SC *et al.* (2012). Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 11(9): 1087-1101
5. World Health Organization. http://www.euro.who.int/surveillance/outbreaks/20070904_1 (bezocht: 2 maart 2010)
6. National Institutes of Health. Research Matters – Chikungunya vaccine shows promise. www.nih.gov/researchmatters/august2014/08252014chikungunya.htm (bezocht: 27 augustus 2015)
7. Pialoux G *et al.* (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis*. 7: 319-327
8. Coffey LL *et al.* (2014). Chikungunya virus-vector interactions. *Viruses*. 6: 4628-4663
9. Cavrini F *et al.* (2009). Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. *J Infect Dev Ctries*. 3: 744-752
10. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Aedes*. www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/species/nsr_taxon.php?id=150629 (bezocht: 7 september 2015)
11. Brown JE *et al.* (2011). *Aedes aegypti* mosquitoes imported into the Netherlands, 2010. *Emerg Infect Dis*. 17(12): 2335-2337
12. Beeuwkes J *et al.* (2011). Surveillance and findings of exotic mosquitoes in used tires in The Netherlands: a methodological approach. *Proc Neth Entomol Soc Meet*. 22: 31-37
13. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Gele koortsmug. www.nvwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/gele-koortsmug/wat-is-de-gele-koortsmug (bezocht: 3 september 2015)
14. Takumi K *et al.* (2009). Introduction, scenarios for establishment and seasonal activity of *Aedes albopictus* in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 9(2): 191-196
15. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. (2014). Draaiboek bestrijding exotische muggen ‘Vondst exotische mug: wat nu?’ www.nvwa.nl/onderwerpen/bacterien-ziekteverwekkers/dossier/vectoren/draaiboek-bestrijding-exotische-muggen (bezocht: 3 september 2015)
16. Public health agency of Canada. Chikungunya virus – Pathogen safety data sheet - infectious substances. www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/chikungunya-eng.php#footnote10 (bezocht: 1 september 2015)
17. Lindenbach BD *et al.* (2013). Flaviviridae. In: Fields Virology. Ed. Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
18. 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>

19. Hernández-Triana LM *et al.* (2014). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health*. 2(271): 1-8
20. National Institutes of Health (2015). NIH-funded vaccine for West Nile virus enters human clinical trials. www.nih.gov/news/health/jul2015/niaid-06.htm (bezoekt: 1 september 2015)
21. Soortenbank.nl. Insecten – Gewone steekmug (*Culex pipiens*). www.soortenbank.nl/soorten.php?soortengroep=insecten&id=661&menuentry=soorten (bezoekt: 3 september 2015)
22. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
23. COGEM (2010). Classificatie van het *Chikungunya virus*. COGEM advies CGM/100304-08
24. Panas *et al.* (2014). The C-terminal repeat domains of nsP3 from the old world alphaviruses bind directly to G3BP. *J Virol*. 88(10): 5888-5893
25. Fros JJ *et al.* (2012). Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J Virol*. 86(19): 10873-10879
26. Pijlman GP *et al.* (2008). A highly structured, nuclease-resistant noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe*. 4: 579-591
27. Griffin DE (2001). Alphaviruses. In: *Fields Virology*. Ed. Knipe MD & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
28. Global biodefense (2015). Characterization of Chikungunya virus in cynomolgus macaques <http://globalbiodefense.com/2015/06/08/characterization-of-chikungunya-virus-in-cynomolgus-macaques/> (bezoekt: 31 augustus 2015)
29. Nir Y *et al.* (1965). West Nile Virus infection in mice following exposure to a viral aerosol. *Br J Exp Pathol*. Vol. 46(4): 443-449
30. Centers for disease control and prevention. Division of vector-borne diseases (2013). West Nile Virus in the United States: guidelines for surveillance, prevention and control. www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf (bezoekt: 1 september 2015)