

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 18 januari 2016  
**KENMERK** CGM/160118-01  
**ONDERWERP** Advies klinische vaccinatiestudie met genetisch gemodificeerde *Plasmodium berghei* parasieten

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag getiteld 'Safety and protective efficacy of genetically modified *Plasmodium berghei* (*Pb(PfCS@UIS4)*) malaria parasites in healthy volunteers,' van het Radboud Universitair Medisch Centrum te Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase I en II vaccinatiestudie met de gg-malariaparasiet *Plasmodium berghei*. Vaccinaties zullen plaatsvinden door middel van beten van muggen die met de gg-parasiet (*Pb(PfCS@UIS4)*), geïnfecteerd zijn.

*P. berghei* is ziekteverwekkend voor knaagdiersoorten uit centraal Afrika, waaronder de Afrikaanse boomrat. Besmetting en overdracht van de parasiet vindt plaats door muggen van het geslacht *Anopheles*. Klinische infecties met *P. berghei* bij mensen zijn nog nooit gerapporteerd. Ook niet bij laboratoriummedewerkers die al jarenlang met de parasiet werken en regelmatig door met *P. berghei* geïnfecteerde muggen worden gestoken. Op basis van de door aanvrager aangeleverde gegevens is de COGEM van mening dat *P. berghei* hoogstwaarschijnlijk niet ziekteverwekkend is voor de mens.

*Pb(PfCS@UIS4)* brengt het zogenoemde circumsporozoïet (CS) gen uit *Plasmodium falciparum* tot expressie. Het CS eiwit wekt de afweerreactie tegen deze malariaparasiet op en zal naar verwachting geen invloed hebben op de pathogeniteit van het ggo.

In het theoretische geval dat een proefpersoon een infectie met *Pb(PfCS@UIS4)* doormaakt, acht de COGEM de kans op verspreiding van de parasiet verwaarloosbaar klein. Gedurende de studie vindt monitoring van de proefpersonen plaats. Het ggo is gevoelig voor anti-malaria medicijnen. Verder komen de muggen die de parasiet mogelijk in het milieu kunnen verspreiden nauwelijks in Nederland voor.

Concluderend acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de voorliggende aanvraag voor een klinische fase 1 en fase 2 studie met *Pb(PfCS@UIS4)* verwaarloosbaar klein.



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

# Klinische vaccinatiestudie met genetisch gemodificeerde *Plasmodium berghei* parasieten

## COGEM advies CGM/160118-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende een fase I/II vaccinatiestudie met de genetisch gemodificeerde (gg-)malariaparasiet *Plasmodium berghei* (Pb). Deze gg-parasiet brengt het circumsporozoïet (CS) eiwit afkomstig uit *Plasmodium falciparum* tot expressie. Dit eiwit is van belang voor de inductie van de afweerreactie tegen *P. falciparum*. Het doel van de studie is om de veiligheid en effectiviteit van het vaccin te testen. De werkzaamheden worden uitgevoerd in het Radboud Universitair Medisch Centrum te Nijmegen (Radboud UMC).

### Parasieten

Parasieten zijn organismen die zich voor het volbrengen van hun natuurlijke ontwikkelingscyclus voeden ten koste van een ander organisme én zich daarbij tijdelijk of permanent in of op hun gastheer vestigen. Parasieten zijn eukaryotische organismen en worden, naast morfologische kenmerken, ook onderscheiden op basis van de manier waarop de interactie tussen gastheer en parasiet plaatsvindt.<sup>1</sup>

Een parasiet doorloopt een aantal fasen in zijn ontwikkeling voordat hij het volwassen stadium bereikt. Deze ontwikkelingsstadia kunnen morfologisch heel verschillend zijn. Er bestaan parasieten die maar één gastheersoort parasiteren (directe levenscyclus), en parasieten die gebruik maken van één of meerdere tussengastheren (indirecte levenscyclus). Bij een aantal parasietensoorten kan in de tussengastheer ongeslachtelijke vermenigvuldiging plaatsvinden. In de eindgastheer ontwikkelt de parasiet zich tot het volwassen stadium en vindt al dan niet geslachtelijke vermenigvuldiging plaats. Vectoren kunnen bijdragen aan de verspreiding van parasieten<sup>1</sup>

### Malaria

Malaria wordt veroorzaakt door de parasiet *Plasmodium*. De infectieziekte gaat aanvankelijk gepaard met griepachtige verschijnselen zoals (hoge) koorts, hoofdpijn, spierpijn en misselijkheid. Afhankelijk van welke plasmodiumsoort de infectie veroorzaakt, kan malaria uiteindelijk leiden tot lever-, nier- en hersenbeschadiging en zelfs tot de dood.<sup>1,2</sup>

Malaria komt voor in de tropische, subtropische en gematigde klimaatgebieden.<sup>2,3</sup> Gemiddeld worden jaarlijks meer dan 200 miljoen ziektegevallen gerapporteerd.<sup>4</sup> Mits tijdig gediagnosticeerd is malaria goed te behandelen, hoewel in endemische gebieden resistentie tegen de gangbaar gebruikte middelen voorkomt.<sup>2,4</sup>

Voor malaria geldt in Nederland een meldingsplicht.<sup>5</sup> De laatste 2 jaar bedraagt de meldingsfrequentie ongeveer 180 ziektegevallen per jaar.<sup>6</sup> Tot 1961 was malaria inheems in Nederland en werd de ziekte veroorzaakt door *Plasmodium vivax* en *Plasmodium malariae*. Door middel van een intensieve surveillance en bestrijding van de parasiet en hun vectoren, is malaria in Nederland thans verdwenen. In Nederland is in 1970 door de WHO officieel malariavrij verklaard.<sup>7</sup> Sindsdien betreffen

malariameldingen doorgaans importgevallen van reizigers die enige tijd in een malariarisicogebied hebben doorgebracht.

Het is bekend dat in de buurt van luchthavens incidenteel gevallen van malaria zijn waargenomen bij mensen die nooit in de tropen zijn geweest.<sup>7,8,9</sup> Deze infecties worden toegeschreven aan de onbedoelde import van geïnfecteerde muggen, en komen voornamelijk voor gedurende de warme zomermaanden.<sup>10</sup>

### ***Plasmodium berghei***

*P. berghei* is een ééncellige intracellulaire malariaparasiet afkomstig uit Centraal Afrika. De parasiet is ziekteverwekkend voor bepaalde knaagdiersoorten uit Centraal Afrika, waaronder de Afrikaanse boomrat (*Grammomys surdaster*). Daarnaast zijn laboratoriumratten, -muizen en -hamsters gevoelig voor een infectie met *P. berghei*.<sup>11</sup> De parasiet komt niet voor in andere zoogdiersoorten. De eindgastheer en transmissievector van *P. berghei* zijn bepaalde steekmuggen uit het geslacht *Anopheles*. Voor de experimenten in onderhavige aanvraag wordt de soort *A. stephensi* gebruikt. Deze steekmug wordt wereldwijd op grote schaal in het laboratorium toegepast voor de infectie van hamsters, ratten en muizen met *P. berghei*.<sup>11</sup> De enige in Nederland voorkomende *Anopheles* muggensoort die *P. berghei* vermoedelijk kan overbrengen is *A. atroparvus*.<sup>12</sup>

### *Levenscyclus*

De levenscyclus van *P. berghei* is complex. De parasiet doorloopt een groot aantal stadia die zich deels in zijn eindgastheer (steekmuggen) en deels in zijn tussengastheer (knaagdieren) afspelen. De infectie van de tussengastheer start met de beet van een met *P. berghei* geïnfecteerde mug. De parasieten worden hierbij in de vorm van zogenoemde sporozoïeten in de bloedbaan geïnjecteerd. Deze sporozoïeten verplaatsen zich via de bloedbaan naar de lever waar zij de levercellen infecteren, zich verder ontwikkelen tot merozoïeten en zich asexueel vermenigvuldigen. Dit zogenaamde leverstadium verloopt asymptomatisch.<sup>2,11</sup>

Na verloop van tijd lyseren de levercellen en komen de merozoïeten vrij in de bloedbaan. Zij infecteren vervolgens de rode bloedcellen waarin verdere asexuele vermenigvuldiging plaatsvindt. Een klein deel van de parasieten ontwikkelt zich in de rode bloedcellen tot vrouwelijke of mannelijke gametocyten (geslachtscellen). Tot aan deze fase verloopt de malaria-infectie asymptomatisch. Na een aantal dagen lyseren de merozoïet geïnfecteerde rode bloedcellen en komen deze vrij in de bloedbaan waarna zij opnieuw rode bloedcellen infecteren. Deze fase van de infectie openbaart zich aan de hand van de kenmerkende malariaziekteverschijnselen. Indien een mug een bloedmaal neemt van een met *Plasmodium* besmette tussengastheer, zullen de merozoïeten en gametocyten opgenomen worden. Bij een ontvankelijke muggensoort ontwikkelen de gametocyten zich tot gameten. In het maagdarmkanaal van de mug vindt kruisbevruchting plaats en versmelten de gameten tot zygoten. Deze zygoten ontwikkelen zich tot sporozoïet en vermenigvuldigen zich. Vervolgens verspreiden de sporozoïeten zich naar de speekselklieren van de mug waarna de levenscyclus van de parasiet zich kan herhalen.<sup>1,2</sup>

### **Beschrijving van het ggo**

Het ggo waarmee de proefpersonen gevaccineerd worden, is gebaseerd op ouderstam *P. berghei* ANKA, c115cy1 en wordt *Pb(PfCS@UIS4)* genoemd. *Pb(PfCS@UIS4)* bevat de sequentie van het circumsporozoïet (CS) gen afkomstig uit *Plasmodium falciparum*, de verwekker van malaria bij de mens. Het CS eiwit is het meest voorkomende eiwit op het oppervlak van de *P. falciparum* sporozoïet en initieert de infectie van de levercellen in geïnfecteerde tussengastheren. Het induceert tevens de afweerreactie tegen de parasiet.

De gensequentie van CS is geïnsereerd in locus 230p van *P. berghei* chromosoom 3 en wordt geflankeerd door UTR sequenties afkomstig uit *P. berghei*. De expressie van het gen staat onder controle van de *P. berghei* UIS4 promotor. In wildtype sporozoïeten reguleert deze promotor de expressie van het UIS4 gen. Dit gen maakt deel uit van de *Up-regulated In Sporozoites* genfamilie en komt alleen in infectieuze sporozoïeten en tijdens het leverstadium van de parasiet tot expressie.

### **Opzet van de klinische studie**

De studie bestaat uit twee fasen. Fase 1 is een dosisescalatiestudie waarbij in totaal 18 proefpersonen, verdeeld over drie groepen, worden blootgesteld aan 5 tot 75 beten afkomstig van met *Pb(PfCS@UIS4)* geïnfecteerde muggen. De muggen nemen het ggo eerst op via een bloedmaal uit geïnfecteerde *specific pathogen free* (SPF) muizen. Infectie van muggen en muizen vindt plaats onder vergunning IG 97-018. Gedurende de vaccinatie bevinden de muggen zich in afgesloten bakken die zijn uitgerust met muskietengaas. De proefpersonen worden geïnfecteerd door de arm tegen het gaas te houden waar de muggen doorheen kunnen steken. Het doel van de fase I studie is om de veiligheid van het ggo te onderzoeken.

Na de blootstelling worden de vrijwilligers gedurende 28 dagen poliklinisch gemonitord. Hierbij wordt onder andere op vaste tijdstippen bloed afgenomen en middels *thick smear analysis* en qPCR gecontroleerd op de aanwezigheid van het ggo in het bloed. Wanneer er gedurende 48 uur een aanhoudende stijging van het aantal parasieten in het bloed te zien is, dan wordt de persoon in kwestie behandeld met anti-malaria medicijnen (Malarone (atovaquone/proguanil) of als alternatief chloroquine of Coartem (artemether/lumefantrine)). Zowel het wildtype als het ggo zijn gevoelig voor deze medicijnen. Uiteindelijk worden alle deelnemers uit de eerste en tweede groep na 28 dagen behandeld met anti-malaria medicijnen. Alleen de proefpersonen uit de derde groep (12 in totaal) gaan verder naar fase 2. De monitoring van de proefpersonen uit groep 1 en 2 wordt 100 dagen na de laatste blootstelling aan het ggo beëindigd.

Tijdens de tweede fase worden de proefpersonen uit groep 3 nogmaals drie keer blootgesteld aan 75 beten afkomstig van *Pb(PfCS@UIS4)* geïnfecteerde muggen. Ongeveer 3 tot 4 weken na de laatste blootstelling worden de proefpersonen gechallengeerd met wildtype *P. falciparum* via de beet van met *P. falciparum* besmette muggen. Het doel van deze fase is om de immunogeniciteit van het vaccin te testen. Ook tijdens deze fase worden de proefpersonen poliklinisch gemonitord. Mocht er een bloedinfectie worden aangetoond, dan wordt de persoon in kwestie direct behandeld met anti-malaria medicijnen. Uiteindelijk worden alle geïnfecteerde proefpersonen 28 dagen na de challenge

experimenten behandeld met anti-malaria medicijnen. De monitoring wordt 100 dagen na de laatste blootstelling aan *P. falciparum* beëindigd.

De aanvrager kan niet precies aangeven hoeveel sporozoïeten er per beet aan de proefpersonen worden toegediend. Geschat wordt dat er ongeveer 10 tot 1000 sporozoïeten per beet worden geïnjecteerd.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft in 2015 over een soortgelijke studie van het Radboud UMC geadviseerd. Het betrof een vaccinatiestudie met een dubbele deletiemutant van *P. falciparum*.<sup>13</sup> De COGEM was van mening dat de deletiemutant biologisch ingeperkt is en hoogst waarschijnlijk niet pathogeen voor mensen is. De COGEM achtte de kans op verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein, omdat de proefpersonen gemonitord worden en vanwege het feit dat een eventuele infectie goed te behandelen is. Daarnaast zijn de muggen van de in Nederland voorkomende vector *A. plumbeus* alleen in de zomermaanden aanwezig. De COGEM concludeerde dat de milieurisico's van deze studie verwaarloosbaar klein zijn.

### **Overweging**

Bij de introductie in het milieu van ggo's zijn voor de milieurisicoanalyse verschillende aspecten van belang zoals de karakterisering, de pathogeniteit, de uitscheiding door de gastheer en de eventuele overleving en verspreiding van het ggo in het milieu. De onderhavige aanvraag bestaat uit een klinische fase I en fase II studie, waarbij proefpersonen gevaccineerd zullen worden met de genetisch gemodificeerde malariaparasiet *Pb(PfCS@UIS4)*. De hierbij van belang zijnde milieu-risicoaspecten worden hieronder puntsgewijs besproken

#### *Moleculaire karakterisering*

De sequenties van uitgangsgenoom *P. berghei* ANKA, c115cy1 en van gg-stam *Pb(PfCS@UIS4)* zijn geanalyseerd met behulp van *whole-genome sequencing* en vergeleken met een referentiesequentie van *P. berghei*. De analyses zijn uitgevoerd door het Wellcome Trust Sanger Institute in het Verenigd Koninkrijk. De analyses bevestigen de identiteit van het oudergenoom en laten zien dat de insertie van het transgen op de verwachte positie aanwezig is. Er is slechts één nucleotide verschil aangetroffen tussen het oudergenoom en het ggo (met uitzondering van de insertie). Deze mutatie zit in een *intragenic region* (het gebied tussen twee genen in) en heeft verder geen consequenties.

#### *Recombinatie*

De aanvrager geeft aan dat overdracht van genetische elementen tussen verschillende plasmodiumsoorten onderling of naar andere organismen nog nooit is gerapporteerd. Daarnaast stelt de aanvrager dat het uitwisselen van genetische elementen tussen verschillende *P. berghei* lijnen alleen kan plaatsvinden gedurende de seksuele vermenigvuldiging in de mug. Aangezien *P. berghei* niet in Nederlandse knaagdierpopulaties, mensen of muggen voorkomt, acht de COGEM de kans op recombinatie tussen het ggo en wildtype *P. berghei* verwaarloosbaar klein.

### *Pathogeniteit*

*P. berghei* is ziekteverwekkend voor bepaalde knaagdiersoorten uit centraal Afrika, waaronder de Afrikaanse boomrat (*Grammomys surdaster*). Onder experimentele omstandigheden kunnen ook laboratoriumratten, -muizen, en -hamsters met *P. berghei* geïnfecteerd worden.<sup>11</sup> De typerende ziekteverschijnselen van malaria treden op als *P. berghei* zich in de bloedbaanfase van het merozoïetstadium bevindt en zich aseksueel vermeerdt in de rode bloedcellen.

Volgens de aanvrager zijn klinische infecties met *P. berghei* bij mensen nog nooit gerapporteerd. Ook niet bij laboratoriummedewerkers die al jarenlang met de parasiet werken en regelmatig door met *P. berghei* geïnfecteerde muggen worden gestoken.

Het CS eiwit komt normaal niet voor gedurende het pathogene bloedstadium van de parasiet en speelt daarom ook geen rol bij de infectie van rode bloedcellen. De promotor van het construct brengt het CS eiwit alleen tijdens het leverstadium van de parasiet tot expressie.

De aanvrager overlegt de resultaten van preklinische experimenten met gehumaniseerde muizen (muizen met humane rode bloedcellen in co-circulatie met de eigen rode bloedcellen). De aanvrager meldt dat een heel laag percentage humane rode bloedcellen (tussen de 0,01 en 0,14%) geïnfecteerd wordt met wildtype *P. berghei* of het ggo. Deze parasieten ontwikkelen zich echter niet verder in de geïnfecteerde humane rode bloedcellen. Deze gegevens wijzen erop dat het ggo niet pathogener is dan wildtype *P. berghei* in gehumaniseerde muizen.

Op basis van de door aanvrager aangeleverde gegevens is de COGEM is van mening dat *P. berghei* hoogst waarschijnlijk niet pathogeen is voor de mens.

### *Uitscheiding en verspreiding*

Na infectie van mensen zal het ggo zich naar verwachting niet ontwikkelen in rode bloedcellen. In het onwaarschijnlijke geval dat er een toch een zogenoemde ‘breakthrough’ infectie optreedt, kunnen er malariasymptomen ontstaan. De proefpersonen worden met behulp van qPCR en *thick smear analysis* gecontroleerd op de aanwezigheid van *P. berghei* parasieten in het bloed. Bij een positieve PCR uitslag wordt er onmiddellijk met een effectieve malariatherapie gestart waardoor de aanwezige parasieten gedood zullen worden. Als extra voorzorgsmaatregel worden alle deelnemers aan het eind van de studie uit voorzorg behandeld met antimalariamiddelen. De COGEM acht de hierboven genoemde maatregelen voldoende om een mogelijke ‘breakthrough’ infectie te bestrijden.

De COGEM wijst er op dat in het theoretische geval een ‘breakthrough’ infectie onopgemerkt blijft, verdere verspreiding van *Pb(PfCS@UIS4)* niet zal optreden. Het ggo kan zich alleen verspreiden via een bloedtransfusie, prikincident of wanneer de proefpersoon buiten de kliniek wordt gestoken met een mug die het ggo (in de vorm van gametocyten) opneemt.

De aanvrager geeft aan dat proefpersonen gedurende de studie en vóór behandeling met antimalaria medicatie, geen bloed of organen mogen doneren. Proefpersonen die met wildtype *P. falciparum* worden gechallenged, mogen gedurende een periode van drie jaar geen bloed doneren.

De kans op een malaria-infectie als gevolg van een prikincident is afhankelijk van de dichtheid van de parasieten in het bloed en de hoeveelheid bloed dat overgebracht wordt. De verwachte dichtheid in het bloed is laag. Het is zeer onwaarschijnlijk dat de parasiet zich in rode bloedcellen kan ontwikkelen

tot merozoïeten. Indien er een prikincident plaatsvindt wordt er via *thick smear analysis* en PCR onderzocht of er een infectie optreedt. Als dat het geval is, wordt er gestart met het toedienen van antimalaria-medicatie.

Het is zeer onwaarschijnlijk dat een proefpersoon buiten de kliniek wordt gestoken door een mug die het ggo kan verspreiden. De eindgastheren en transmissievectoren van *P. berghei* komen in Nederland niet voor. Er zijn volgens de aanvrager aanwijzingen dat *P. berghei* ook door *A. atroparvus* verspreid kan worden, maar deze mug komt in Nederland slechts sporadisch voor en dan vooral in de kustgebieden.<sup>12</sup> De ontwikkeling van *P. berghei* duurt ongeveer 14 dagen bij een optimale temperatuur van 20°C. In de natuur leeft *A. atroparvus* gemiddeld 1 tot 2 weken. De kans dat gedurende deze tijdsperiode de parasiet zich actief in de mug ontwikkelt tot sporozoïeten, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Er zijn ook geen aanwijzingen dat de parasiet in niet-*Anopheles* muggen kan overleven.

Samengevat acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat tijdens de voorgenomen klinische studie verspreiding van *Pb(PfCS@UIS4)* naar het milieu plaats zal vinden.

### Conclusie en advies

Omdat *Pb(PfCS@UIS4)* hoogst waarschijnlijk niet pathogeen is voor de mens, de kans dat het ggo zich in het milieu verspreidt verwaarloosbaar klein is, en er beheersmaatregelen genomen worden in het geval van een theoretische ‘breakthrough’ infectie, acht de risico’s voor mens en milieu bij de voorliggende aanvraag voor een klinische fase 1 en fase 2 studie met *Pb(PfCS@UIS4)* verwaarloosbaar klein.

### Referenties

1. In: The encyclopedia of Parasitology (2008). Ed Mehlhorn H. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
2. Fairhurst RM & Wellems TE (2010). *Plasmodium* species (malaria). In: Principles and Practice of Infectious diseases. 7th edition. Eds Mandell GL *et al.* Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia
3. Hay SI *et al.* (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. PLOS Medicine 7: e1000209
4. World Health Organization. Factsheet on the World Malaria Report 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> (bezocht 12 januari 2015)
5. RIVM. Meldingsplicht infectieziekten. [www.rivm.nl/Onderwerpen/M/Meldingsplicht\\_infectieziekten/Welke\\_infectieziekten\\_zijn\\_meldingsplichtig](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/M/Meldingsplicht_infectieziekten/Welke_infectieziekten_zijn_meldingsplichtig) (bezocht 31 augustus 2015)
6. RIVM. State of infectious diseases in the Netherlands in 2013. [www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/150205001.pdf](http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/150205001.pdf) (bezocht 12 januari 2015)
7. Berger S (2015). Malaria: Global status. In: Gideon Informatics. Los Angeles, California. 284-286
8. Ponnudurai T *et al.* (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to *in vitro* culture. Trop. Geogr. Med. 33: 50-54



9. Delemarre BJ & van der Kaay HJ (1979). Tropical malaria contracted the natural way in the Netherlands. Ned Tijdschr Geneesk 123: 1981-1982
10. Takken W *et al.* (1999). Terugkeer van endemische malaria in Nederland uiterst onwaarschijnlijk. Ned. Tijdschr. Geneesk. 143: 836- 838
11. Introduction to *P. berghei*. [www.lumc.nl/org/parasitologie/research/malaria/berghei-model/introduction-berghei/](http://www.lumc.nl/org/parasitologie/research/malaria/berghei-model/introduction-berghei/) bezocht: 6 januari 2016
- <sup>12</sup>. Takken W *et al.* (2002). Distribution and Dynamics of Larval Populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the Delta of the Rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. *Ambio* Vol. 31 No. 3
13. COGEM (2015). Klinische malariavaccinatie studie met genetisch gemodificeerde *Plasmodium falciparum* en muggen (Radboud UMC). COGEM advies CGM/150907-04