

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

DATUM 10 december 2020
KENMERK CGM/201210-02
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie en inschaling werkzaamheden (chimere) flavivirussen

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een 2.8 combinatieverzoek IG 20-245_2.8-000 getiteld 'Chimere virussen II en III', ingediend door Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de wijziging van een vergunning voor werkzaamheden met genetische gemodificeerde (chimere) flavivirussen. De COGEM is gevraagd om het Binjari virus (BinJV) te classificeren en te adviseren over het inperkingsniveau waarop werkzaamheden met chimere virussen, waarbij structurele genen uitgewisseld worden tussen enerzijds Zika virus (ZIKV) of West Nile virus (WNV) en anderzijds BinJV of Palm Creek Virus (PCV), verricht kunnen worden.

BinJV behoort, net zoals PCV, tot de zogenaamde insect-specifieke flavivirussen (ISFs). Deze virussen infecteren alleen insecten en zijn niet in staat in zoogdiercellen te repliceren. De COGEM adviseert om BinJV als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2 in te delen en op te nemen op Bijlage 4 van de Regeling ggo.

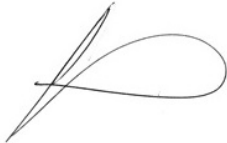
ZIKV en WNV kunnen mensen infecteren en ernstige ziekte veroorzaken. De COGEM adviseert om werkzaamheden waarbij in gg-ZIKV (als 'backbone') de structurele genen (prME) vervangen zijn door die van BinJV en PCV, op ML-III uit te voeren onder inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. De COGEM adviseert om werkzaamheden met gg-PCV of gg-BinJV (als 'backbone') waarin de structurele genen vervangen zijn door die van ZIKV of WNV, op ML-II uit te voeren met inachtneming van enkele aanvullende maatregelen.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op de betreffende inperkingsniveau's, met inbegrip van de aanvullende 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,



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 belangenverstremeling is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie van het Binjari virus en inschaling van werkzaamheden met (chimere) flavivirussen

COGEM advies CGM/201210-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een 2.8 combinatieverzoek van Wageningen Universiteit (IG 20-245). Het eerste deel van dit verzoek betreft de pathogeniteitsclassificatie van het flavivirus Binjari virus (BinJV) en opname van dit virus op bijlage 4 van de Regeling ggo.¹ Het tweede deel van dit verzoek betreft de inschaling van werkzaamheden met chimere genetisch gemodificeerde (gg-)flavivirussen van *Zika virus* (ZIKV), *West Nile virus* (WNV), Palm Creek Virus (PCV) en BinJV. Vier van deze chimere flavivirussen zullen de backbone van PCV of BinJV bevatten, waarbij de structurele eiwitten (prME) van deze virussen zijn vervangen door die van ZIKV of WNV. De aanvrager verzoekt werkzaamheden met deze gg-virussen uit te voeren op inperkingsniveau ML-II. De andere twee virussen zullen een ZIKV backbone bevatten waarbij de structurele eiwitten (prME) zijn vervangen door die van PCV of BinJV. Hierbij wordt door de aanvrager een vergunning verzocht om handelingen met deze chimeren te mogen uitvoeren op inperkingsniveau ML-III.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt,

terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

2.1 Strikt dierpathogene virussen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.² De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt: *Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.*

De overweging die de COGEM hanteert om dierpathogenen te classificeren wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.³ De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

3.1 Algemene kenmerken flavivirussen

Flavivirussen zijn arbovirussen en behoren tot de familie van de *Flaviviridae*.⁴ 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.⁴ 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).^{5,6} Met uitzondering van TBEV (overgedragen door teken), worden WNV, YFV, JEV, DENV, ZIKV en USUV door muggen overgedragen naar de mens. Naast flavivirussen die bij vertebraten infecties kunnen

veroorzaken, zijn er ook flavivirussen die alleen insecten en geen vertebraten kunnen infecteren (insect-specifieke flavivirussen; ISFs).

Flavivirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kb, en de virusdeeltjes worden omhuld door een membraan.^{7,8} Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne,⁹ 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.⁶ 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.¹⁰ De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA replicatie en de verwerking van het polyproteïne.¹¹ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij ‘budding’ via het ER-membraan optreedt.¹²

3.2 West Nile virus (WNV) en Zika virus (ZIKV)

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.¹³ ZIKV is oorspronkelijk geïsoleerd uit non-humane primaten.¹⁴ Zowel WNV als ZIKV kunnen bij mensen neurologische problemen veroorzaken, zoals meningitis of encefalitis.^{15,16} In zeldzame gevallen kan een ZIKV-infectie het Guillain Barré Syndroom veroorzaken, een neuromusculaire verlamming die ontstaat doordat het afweersysteem het zenuwstelsel aanvalt.^{17,18,19} 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 ongeboren kind.^{16,19}

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.²⁰ 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.^{21,22}

3.3 Binjari Virus (BinJV) en Palm Creek Virus (PCV)

PCV is een in 2013 ontdekt ISF dat in muggen van de soort *Coquillettidia xanthogaster*, maar ook in *Culex* spp voorkomt.²³ ISFs zijn niet in staat te repliceren in cellen van vertebraten.²⁴ Dit kan te maken hebben met barrières in het vermogen van het virus de cel binnen te dringen, in de cel te repliceren, of virusdeeltjes te assembleren en uit de cel vrij te komen, maar ook met het immuunsysteem van de gastheer.^{24,25} Voor onder meer PCV is aangetoond dat dit virus niet in staat is te repliceren in verschillende cellijnen van vertebraten.^{23,26}

BinJV is geïsoleerd uit *Aedes normanensis* en voor het eerst gekarakteriseerd in 2016.²⁷ Hoewel de structurele eiwitten prME van BinJV de binnenkomst van het virus in cellen van vertebraten faciliteren, blijkt dit proces inefficiënt en vind replicatie van het virus in vertebratencellen niet plaats.^{27,28}

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wenst een aantal combinaties te maken tussen de backbone en de structurele eiwitten prME van ZIKV, WNV, BinJV en PCV. De chimere die de aanvrager verzoekt te maken zijn als volgt:

1. BinJV backbone met de structurele eiwitten (prME) van ZIKV: BinJV/ZIKV-prME
2. BinJV backbone met de structurele eiwitten (prME) van WNV: BinJV/WNV-prME
3. PCV backbone met de structurele eiwitten (prME) van ZIKV: PCV/ZIKV-prME
4. PCV backbone met de structurele eiwitten (prME) van WNV: PCV/WNV-prME
5. ZIKV backbone met de structurele eiwitten (prME) van BinJV: ZIKV/BinJV-prME
6. ZIKV backbone met de structurele eiwitten (prME) van PCV: ZIKV/PCV-prME

De aanvrager vraagt om werkzaamheden, met de virussen die de backbone van BinJV of PCV bevatten, in associatie met animale cellen te mogen uitvoeren op ML-II.

Voor werkzaamheden met virussen die een ZIKV backbone bevatten waarmee animale cellen worden geïnfecteerd en gebruikt voor productie, verzoekt de aanvrager een inschaling op ML-III inperkingsniveau, waarbij de volgende aanvullende werkvoorschriften gehanteerd zullen worden:

- a. Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II.
- b. Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt.
- c. Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.

De vectoren die de sequenties van de chimere virussen bevatten, zullen geproduceerd worden door middel van de CPER methode.²⁹ Bij deze methode wordt circulair viraal DNA vervaardigd met behulp van ligatie van verschillende overlappende PCR fragmenten, waardoor kloneren in *Escherichia coli* overbodig is. De vectoren die de sequenties van de virussen met de ZIKV backbone bevatten zullen bovendien worden gekloneerd in vector pCC1-BAC (Epicenter).

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2019 geadviseerd om PCV als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen op bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo.³⁰ De COGEM heeft nog niet geadviseerd over de classificatie van BinJV.

De COGEM heeft eerder geadviseerd over werkzaamheden van de aanvrager in kwestie met gg-flavivirus chimere in associatie met animale cellen³¹, waarbij werkzaamheden met gg-ZIKA en gg-WNV zijn ingeschaald op ML-III met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften. De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met de diverse flavivirus chimere die in deze aanvraag worden behandeld.

6. Overweging en advies

6.1 Overweging en advies betreffende de pathogeniteitsclassificatie van BinJV

BinJV is voor het eerst gekarakteriseerd in 2016 en is uit *Aedes normanensis* in Australië geïsoleerd.²⁷ Het virus wordt tot de zogenaamde ISFs gerekend. ISFs zijn niet in staat vertebratencellen te infecteren en veroorzaken geen ziekte bij mensen of zoogdieren.²⁷ Uit fylogenetische vergelijkingen komt naar voren dat BinJV dichter verwant is aan vertebrat-infecterende flavivirussen (VIF), zoals ZIKV, dan PCV.²⁸ Desondanks zijn er geen aanwijzingen dat BinJV cellen van vertebraten kan infecteren en dat het virus alleen kan repliceren in bepaalde muggensoorten.²⁸ Ook is BinJV nog nooit in verband gebracht met ziekte bij mensen.

Alles overwegende adviseert de COGEM om BinJV in te delen in pathogeniteitsklasse 2 als strikt dierpathogeen en op te nemen in Bijlage 4 van de Regeling ggo.

6.2 Overweging en advies betreffende de inschaling van werkzaamheden met gg-BinJV, gg-PCV, gg-WNV en gg-ZIKV

6.2.1 In vitro handelingen met BinJV/WNV-prME, BinJV/ZIKV-prME, PCV/WNV-prME en PCV/ZIKV-prME in associatie met animale cellen

In de aanvraag wordt verzocht werkzaamheden met BinJV/WNV-prME, BinJV/ZIKV-prME, PCV/WNV-prME en PCV/ZIKV-prME in associatie met animale cellen uit te mogen voeren op ML-II. Tevens is de COGEM gevraagd of het de volgende voorgestelde aanvullende maatregelen noodzakelijk acht: het dragen van handschoenen, het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II, en zorg dragen dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van ZIKV, WNV en andere verwante virussen.

Zowel PCV als BinJV zijn strikt dierpathogenen in pathogeniteitsklasse 2 die alleen insecten kunnen infecteren. Het gastheertropisme van flavivirussen wordt bepaald door zowel de structurele eiwitten, als de niet-structurele eiwitten.²⁵ Een gg-PCV waarin de structurele eiwitten prME waren vervangen door die van WNV (PCV/WNV-prME), bleek niet in staat om BHK- en Vero- cellen te infecteren. Een gg-WNV waarin deze structurele eiwitten waren vervangen door die van PCV (WNV/PCV-prME), was hier eveneens niet toe in staat.²⁴ Beide chimere flavivirussen waren ook niet in staat te repliceren in muizenfibroblastcellen (MEFs) waarin de interferon α - en β - receptoren waren verdwijnd.²⁴ Een gg-BinJV waarin de structurele eiwitten prME waren vervangen door die van WNV (BinJV/WNV-prME), bleek bij 37°C niet in staat te repliceren in verschillende vertebratencellen, waaronder een aantal varianten met een defect viraal afweersysteem wegens het ontbreken van de interferon α receptor (IFNAR) of RNAse L.²⁸ Bij 34°C was BinJV/WNV-prME echter wel in staat, doch zeer beperkt, te repliceren in muizenfibroblastcellen met een defect viraal afweersysteem en in BSR-cellen, maar dit laatste experiment bleek slecht reproduceerbaar.²⁸ Een gg-BinJV waarin de structurele eiwitten prME waren vervangen door die van ZIKV (BinJV/ZIKV-prME), kon niet repliceren in vertebratencellen en in immuun-gecompromitteerde muizen.²⁷

Op grond van bovenstaande resultaten is de COGEM van oordeel dat de virulentie en het tropisme van de gg-ISFs niet zal veranderen ten opzichte van de wildtype ISFs, en de virusdeeltjes niet in staat zullen zijn om vertebratencellen te infecteren. De COGEM adviseert de voorgestelde werkzaamheden met de beschreven gg-BinJV en gg-PCV uit te voeren op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van de volgende aanvullende maatregelen:

- het dragen van handschoenen
- het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II
- en zorg dragen dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van ZIKV, WNV en andere verwante virussen.

Op dit inperkingsniveau en met deze aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

6.2.2 In vitro handelingen met ZIKV/BinJV-prME en ZIKV/PCV-prME

In de aanvraag wordt een wijziging in de vergunning verzocht om werkzaamheden met gg-ZIKV (ZIKV/BinJV-prME en ZIKV/PCV-prME) in associatie met animale cellen uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-III. De aanvrager is voornemens daarbij een aantal aanvullende inperkingsvoorschriften te hanteren. Deze voorschriften bevatten het uitsluiten van zwangere medewerkers van werkzaamheden en het tot een minimum beperken van het gebruik van 'sharps'.

ZIKV kan tot ernstige gezondheidsproblemen en in zeldzame gevallen tot het Guillain Barré Syndroom leiden. Transmissie van ZIKV van mens naar mens vindt via muggen plaats, maar er is voor dit virus ook verticale transmissie van moeder op kind tijdens de zwangerschap mogelijk, en het is overdraagbaar via seksueel contact. Hoewel er geen wetenschappelijke literatuur beschikbaar is over gg-ZIKV waarbij de structurele eiwitten prME zijn vervangen door die van BinJV of PCV, zijn er wel resultaten beschikbaar over een gg-WNV waarin de structurele eiwitten prME zijn vervangen door die van BinJV. Deze gg-WNV/BinJV-prME kan goed repliceren in muggencellen, hoewel de geproduceerde virusaantallen 100 tot 1000 keer lager zijn dan die van wildtype BinJV en WNV.²⁸ Het gg-WNV/BinJV-prME is bij zowel 34°C als op 37°C in staat te repliceren in vertebratencellen, hoewel minder cellen geïnfecteerd worden met dit chimere virus dan voor wildtype WNV. In de regel leidt uitwisseling van genen tussen verschillende virussoorten tot attenuatie.

Op grond van bovenstaande resultaten is de COGEM van oordeel dat er geen reden is om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit van ZIKV/BinJV-prME en ZIKV/PCV-prME hoger zal zijn dan voor het wildtype virus. De COGEM acht dat bij werkzaamheden met ZIKV/BinJV-prME en ZIKV/PCV-prME op inperkingsniveau ML-III, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende maatregelen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

6.3 Conclusie

De COGEM adviseert om BinJV in te delen in pathogeniteitsklasse 2 als strikt dierpathogeen en als zodanig op te nemen op Bijlage 4 van de Regeling ggo. Tevens adviseert de COGEM de werkzaamheden met de gg-virussen met een BinJV en PCV backbone uit te voeren op inperkingsniveau ML-II en oordeelt zij dat de voorgestelde aanvullende maatregelen noodzakelijk zijn. De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met de virussen gebaseerd op de ZIKV backbone uit te voeren op inperkingsniveau ML-III met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. De COGEM acht dat bij het hanteren van de voorgestelde inperkingsmaatregelen bij de voorgenomen werkzaamheden, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht 3-12-2020)
2. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
3. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 28 januari 2020)
5. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
6. Laureti M *et al.* (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front. Immunol.* 9: 2180
7. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: *Fields virology*, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
8. Simmonds P *et al.* (2017). ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 98: 2-3
9. 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
10. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
11. 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
12. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: *Fields Virology*. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
13. 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>
14. Gutierrez-Bugallo G *et al.* (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nature Ecology & Evolution*, 3: 561-569
15. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2018). <https://www.rivm.nl/arbovirussen> (bezocht: 16 juli 2019)

16. Best SM (2016). Flaviviruses. *Curr. Biol.* 26: R1258-R1260
17. Oehler E *et al.* (2014). *Zika virus* infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. www.eurosurveillance.org
18. 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)
19. Miner JJ & Diamond MS (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe.* 21: 134-142
20. 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)
21. World Health Organization (WHO, 2017). Zika virus Key facts <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> (bezoekt: 27 oktober 2020)
22. Sakkas H *et al.* (2018). An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens* 7: 66
23. Hobson-Peters J *et al.* (2013). A new insect-specific flavivirus from Northern Australia suppresses replication of West Nile Virus in co-infected mosquito cells. *Plos One.* 9: e56534
24. Piyasena TBH *et al.* (2017). Infectious DNAs derived from insect-specific flavivirus genomes enable identification of pre- and post-entry host restrictions in vertebrate cells. *Scientific Reports.* 7:2940
25. Junglen S *et al.* (2016). Host range restriction of insect-specific flaviviruses occurs at several levels of the viral life cycle. *mSphere.* 2:e00375-16
26. COGEM (2019). Characteristics and pathogenicity determination of insect-specific RNA and DNA viruses. Onderzoeksrapport CGM/2019-01
27. Hobson-Peters J *et al.* (2019). A recombinant platform for flaviviruses vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Science translational medicine.* 11:eaax7888
28. Harrison JJ *et al.* (2020) Antigenic Characterization of New Lineage II Insect-Specific Flaviviruses in Australian Mosquitoes and Identification of Host Restriction Factors. *mSphere* 5:e00095-20
29. Edmonds J *et al.* (2013). A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity. *Journal of Virology.* 4:2367-2372
30. COGEM (2019). Generiek advies pathogeniteitsclassificatie insect-specifieke virussen. COGEM advies CGM/190715-01
31. COGEM (2020). Inschaling werkzaamheden met flavivirus en alphavirus chimere. COGEM advies CGM/201105-01.