

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. V.L.W.A. Heijnen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 18 juli 2023  
**KENMERK** CGM/230718-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden tetravalent Denguevirusvaccin

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over vergunningaanvraag (IG 23-097\_2.8-000) met als titel 'Omlaagschaling tetravalent Dengue vaccine' van MSD, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) tetravalent Denguevirus vaccin. Het vaccin is samengesteld uit vier denguevirus (DENV) stammen van de serotypen 1 - 4: rDENV1Δ30, rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 en rDENV4Δ30. In deze vier stammen zijn 30 nucleotiden uit de 3' UTR van het genoom verwijderd, waardoor de virale replicatie is aangetast. In rDENV3Δ30/31 is een extra deletie van 31 nucleotiden aangebracht, en in rDENV2/4Δ30(ME) zijn de genen coderend voor (Pr)M en E van DENV-4 vervangen voor die van DENV-2. De vaccinstammen zijn hierdoor verzwakt in muizen, primaten en in de mens. In het bloed van proefpersonen worden lagere virustiters bereikt, waardoor overdracht van mens op mug, de primaire overdrachtsroute, is verstoord. Dit is voor één van de vaccinstammen ook experimenteel bevestigd.

De COGEM is van oordeel dat de vaccinstammen verzwakt zijn ten opzichte van wildtype DENV. De beschrijving van de werkzaamheden in de aanvraag is te summier om ze te kunnen inschalen. De COGEM maakt daarom onderscheid tussen mogelijke werkzaamheden waarbij de vaccinstammen verder genetisch gemodificeerd worden, en werkzaamheden waarbij dat niet het geval is. Indien de vaccinstammen onveranderd blijven, adviseert de COGEM de werkzaamheden op ML-I plaats te laten vinden. Indien wel sprake is van enigerlei aanpassing van de vaccinstammen, dienen de handelingen uitgevoerd te worden op ML-II. In beide gevallen adviseert de COGEM als aanvullend voorschrift dat cellen die gebruikt worden om het ggo te kweken, vrij moeten zijn van verwante flavivirussen om te voorkomen dat de verwijderde sequenties kunnen worden hersteld door recombinatie.



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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

***Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM-lid dr.ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies***

# Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd tetravalent Denguevirusvaccin

## COGEM advies CGM/230718-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor de omlaagschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-), levend geattenuëerd tetravalent Denguevirus kandidaatvaccin. De aanvraag is afkomstig van MSD (IG 23-097). Het vaccin is samengesteld uit Denguevirus (DENV-) stammen van de serotypen 1, 2, 3 en 4: rDENV1Δ30, rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 en rDENV4Δ30. De aanvrager stelt dat het kandidaatvaccin sterk geattenuëerd is ten opzichte van wildtype DENV en vraagt een omlaagschaling aan naar ML-I voor werkzaamheden met dit vaccin.

### 2. Denguevirus

DENV (species *Orthoflavivirus denguei*, genus *Orthoflavivirus*, familie *Flaviviridae*)<sup>1</sup> is een arbovirus en kan via geïnfecteerde *Aedes* muggen, in het bijzonder *Ae. aegypti* (gelekoortsmug) of *Ae. albopictus* (Aziatische tijgermug), overgedragen worden naar de mens.<sup>2</sup> Er zijn vier serotypen DENV (serotype 1, 2, 3 en 4) die alle vier onder dezelfde soort worden geschaard.<sup>3</sup> Het merendeel van de infecties met DENV verloopt zonder ziekteverschijnselen. Echter, het virus kan ook 'dengue fever' (knokkelkoorts) veroorzaken. Een klein deel van de infecties leidt tot levensbedreigende ziekte zoals hemorragische koorts ('dengue hemorrhagic fever' (DHF)) of 'dengue shock syndroom' (DSS).<sup>4</sup> Bijna de halve wereldbevolking leeft in gebieden met een risico op een dengue-infectie, zoals Afrika, Zuidoost-Azië, Centraal- en Zuid-Amerika en het Caribisch gebied.<sup>2,4</sup> Geschat wordt dat er 100 tot 400 miljoen DENV-infecties per jaar optreden.<sup>5</sup> Na een eerdere infectie met DENV is er een verhoogd risico op het ontstaan van ernstige dengue bij een opvolgende infectie met een ander serotype DENV. Dit verschijnsel, waarbij al aanwezige antilichamen tegen DENV een kruisreactie opwekken tegen het nieuwe serotype en daarmee de opname van DENV in de cel vergroten, wordt 'antibody-dependent enhancement' (ADE) genoemd.<sup>6</sup>

De voornaamste route van infectie verloopt via muggenbeten; DENV kan echter ook tijdens de zwangerschap van moeder op kind worden overgedragen. In zeldzame gevallen vindt overdracht plaats via bloedproducten of tijdens orgaandonatie.<sup>5</sup>

DENV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom van circa 11 kb, dat is omhuld door een lipidemembraan.<sup>7,8</sup> Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne, waarbij het open leesraam ('open reading frame', ORF) aan weerszijden wordt geflankeerd door een 'untranslated region' (UTR).<sup>8,9</sup> Door splitsing van het polyproteïne worden verschillende structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.<sup>3,7,8</sup> Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn envelopeiwitten, die zich in de lipidemembraan om de nucleocapside bevinden. (pr)M en E zijn betrokken bij de binding van het virus aan de cellulaire

receptor, de fusie van het virale membraan (de ‘envelop’) met het membraan van de gastheer cel, en de immuniteit tegen het virus.<sup>7</sup> De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA-replicatie en de verwerking van het polyproteïne.<sup>3,7,8,10</sup> De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheer cel, waarbij afsnoering (‘budding’) via het ER-membraan optreedt.<sup>10</sup>

### **3. De tetravalente Denguevirus kandidaatvaccin**

Het tetravalente DENV kandidaatvaccin is samengesteld uit gg-virussen afkomstig van de DENV serotypen 1, 2, 3 en 4. In alle vier stammen zijn 30 nucleotiden uit de 3’-UTR van het genoom verwijderd, waardoor een sterk geconserveerde secundaire structuur van het DENV 3’UTR (een stemloop-structuur) dat geassocieerd is met de virale replicatie, is aangetast.<sup>11,12,13</sup> Stam rDENV3Δ30/31 bevat een extra deletie van 31 nucleotiden in de 3’ UTR, 55 nucleotiden ‘upstream’ van de 30 nucleotiden deletie.<sup>14</sup> In stam rDENV2/4Δ30(ME) zijn de genen coderend voor (Pr)M en E van DENV-4 vervangen voor die van DENV-2.<sup>11,15</sup>

### **4. Werkzaamheden met het tetravalente Denguevaccin**

De aanvrager geeft aan dat de vaccinstammen sterk geattenuëerd zijn t.o.v. de wildtype DENV serotypen als het gaat om virusreplicatie in mug en mens, en op basis van verminderde viremie na infectie. Hij vraagt daarom een omlaagschaling naar ML-I voor laboratoriumactiviteiten met het tetravalente DENV-vaccin. De aanvrager heeft de werkzaamheden niet nader gespecificeerd dan “het bepalen van de samenstelling van een levend GGO vaccin (‘potency’, ‘sterility’, ‘identity’, virustiterbepalingen, etc.)”.

### **5. Eerder COGEM advies en classificaties van andere organisaties**

DENV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>16</sup> In door de aanvrager geleverde informatie staat vermeld dat het onderhavige levend geattenuëerde tetravalente DENV vaccin door Sciensano in België en de ‘Zentrale Kommission für biologische Sicherheit’ (ZKBS) in Duitsland is ingeschaald in ‘risk group’ 1. De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

### **6. Overweging**

Al vele jaren wordt onderzoek gedaan naar een goed werkend vaccin tegen DENV. De componenten van het tetravalente vaccin uit de onderhavige adviesvraag zijn door het ‘National Institutes of Health’ (NIH) in de Verenigde Staten ontwikkeld, en zelfstandig of in combinaties getest in verschillende (pre)klinische studies.<sup>17</sup> Het levend verzwakte kandidaatvaccin is bekend onder meerdere namen, waaronder V181 en Butandan-DV. In elk van de vier vaccinstammen zijn 30 nucleotiden uit de 3’-UTR van het genoom verwijderd. Stam rDENV3Δ30/31 bevat in de 3’-UTR een extra deletie van 31 nucleotiden en in stam rDENV2/4Δ30(ME) zijn de genen coderend voor (Pr)M en E van DENV-4 vervangen voor die van DENV-2. Door de deleties is een sterk geconserveerde stemloop-structuur aangetast die belangrijk is voor de replicatie van het DENV-genoom.<sup>12,13</sup> In de aanvraag is onder andere informatie aangeleverd over de pathogeniteit, het transmissiepotentieel en de stabiliteit van het kandidaatvaccin.

De COGEM merkt op dat de beschrijving van de werkzaamheden in de onderhavige aanvraag zeer summier is en onduidelijk is wat de voorgenomen werkzaamheden precies inhouden.

### **6.1 Pathogeniteit van de vaccinstammen**

De vier vaccinstammen repliceren langzamer en behalen een iets lagere eindtiter in vergelijking met de overeenkomstige wildtype DENV-stammen in Vero-cellen.<sup>11,14</sup> Ook in SCID-Huh-7 muizen, die een diermodel zijn voor humane leverinfectie, en in resusapen zijn de DENV vaccinstammen verzwakt en leidt infectie tot verminderde viremie in vergelijking tot infectie met wildtype DENV.<sup>11,15,18,19,20</sup> De vaccinstammen zijn individueel en in verschillende combinaties als vaccin getest in verschillende klinische studies.<sup>o.a.17,21,22,23,24</sup> Het tetravalente vaccin lijkt veilig te zijn, minder viremie op te leveren dan het wildtype DENV en bescherming te bieden tegen de vier serotypen DENV.

Alles overwegende is de COGEM van oordeel dat de vier vaccinstammen die onderdeel uitmaken van het tetravalente DENV kandidaatvaccin verzwakt zijn ten opzichte van wildtype DENV.

### **6.2 Recombinatie en stabiliteit**

Alle vier de rDENV vaccinstammen bevatten minstens een deletie van 30 nucleotiden in de 3'-UTR, die zorgt voor een verminderde virusreproductie. In de chimere stam rDENV2/4Δ30(ME) heeft daarnaast nog uitwisseling plaatsgevonden van de (pr)M en E genen met de overeenkomstige genen van serotype 2. rDENV3Δ30/31 bevat een additionele deletie van 31 nucleotiden in de 3'UTR, 'upstream' van de 30 nucleotiden deletie. De aanvrager stelt dat de attenuering van DENV door grotere deleties in het RNA-genoom stabiel is dan wanneer het virus door puntmutaties is geattenuerd. In een door de aanvrager aangeleverd document, betreffende de risicobeoordeling van het onderhavige kandidaatvaccin (V181) door het Duitse ZKBS, is aangegeven dat bij de productie van het vaccin zowel het 'master seed virus', 'working seed virus' als het eindproduct zijn gesequenced, en hierbij alleen enkele puntmutaties zijn waargenomen. Er heeft geen reversie van de 30 nucleotiden deletie plaatsgevonden. In (pre)klinische studies waar dit kandidaatvaccin onderzocht is, zijn tevens geen meldingen gemaakt van ernstige bijwerkingen, die mogelijk ten gevolge van reversie (herstel van virulentie) op zouden kunnen treden.<sup>21,22,23,24</sup>

Recombinatie treedt weinig op bij flavivirussen, maar er zijn gevallen van recombinatie van DENV beschreven.<sup>25,26,27,28,29,30,31</sup> In het geval er recombinatie optreedt tussen de vier vaccinstammen, zal dit leiden tot vergelijkbaar verzwakte gg-virussen, omdat de stammen vergelijkbare attenuerende deleties op dezelfde positie in het genoom bevatten. De kans dat recombinatie van de vaccinstammen met wildtype DENV zal optreden in een eventueel besmette medewerker is verwaarloosbaar klein, omdat DENV niet van nature in Nederland voorkomt.

De COGEM is van oordeel dat de deletie in de 3'-UTR van de vier vaccinstammen genetisch stabiel is en dat de kans verwaarloosbaar klein is dat de stammen (terug) zullen reverteren naar wildtype DENV.

### **6.3 Transmissie van de vaccinstammen**

De voornaamste route van infectie van DENV verloopt via muggenbeten. Besmetting van mens op mens komt nauwelijks voor, maar is mogelijk tijdens de zwangerschap (van moeder op kind) of in zeldzame gevallen via bloedproducten of tijdens orgaandonatie.<sup>5</sup> DENV kan zich niet via aerosolen verspreiden. COGEM acht het aannemelijk dat de verspreidingsroute van de recombinante DENV-vaccinstammen onveranderd is in vergelijking met wildtype DENV.

Uit verschillende studies blijkt dat de vaccinstammen niet efficiënt overgedragen kunnen worden vanuit de mens naar de muggen die als vector optreden voor DENV transmissie (*Ae. aegypti* of *Ae. albopictus*). De vaccinstammen rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 en rDENV4Δ30 zijn geattenuëerd in muggencellen (C6/36 cellen) en in muggen,<sup>14,15,32</sup> terwijl de replicatie van rDENV1Δ30 vergelijkbaar is met wildtype virus in muggen.<sup>18</sup> De virustiters van de vaccinstammen die na vaccinatie in het bloed van proefpersonen aanwezig zijn, zijn lager dan minimaal nodig is voor transmissie naar muggen.<sup>11,18,21,32,33</sup> De stam rDENV4Δ30 bleek niet te kunnen worden overgedragen in een experiment waarbij meer dan 350 *Ae. albopictus* muggen zich voedden op tien proefpersonen die geïnfecteerd waren met een dosis die 100-maal hoger was dan de dosis die in het vaccin aanwezig is.<sup>32</sup>

De COGEM is van oordeel dat de kans op transmissie van de vier vaccinstammen van een eventueel besmette medewerker naar muggen, verwaarloosbaar klein is. Daarbij merkt zij eveneens op dat de natuurlijke vectoren van DENV: de Aziatische tijgermug en gelekoortsmug, weliswaar incidenteel aangetroffen worden in Nederland, maar bestreden worden en zich niet in Nederland hebben gevestigd.<sup>34,35</sup>

### **7. Advies**

DENV kan zich niet via aerosolen verspreiden en de COGEM acht het niet aannemelijk dat de recombinante DENV-stammen dit wel zouden kunnen. De stammen van het kandidaatvaccin zijn (individueel en in combinaties) in verschillende klinische studies getest, waarbij geen ernstige bijwerkingen zijn gerapporteerd. Resultaten uit (pre)klinisch onderzoek tonen aan dat de vier rDENV stammen geattenuëerd zijn, en dat deze slecht repliceren in muggen en mensen. Indien een medewerker ten gevolge van een prikaccident zichzelf zou infecteren met het kandidaatvaccin, acht de COGEM de kans op het ontstaan van een ernstig ziektebeeld verwaarloosbaar klein. Daarnaast acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het kandidaatvaccin zich vervolgens verder zou kunnen verspreiden via muggen, vanwege de verminderde replicatie in muggen, de lage virustiters na onbedoelde blootstelling en het feit dat de natuurlijke vectoren (*Ae. aegypti* of *Ae. albopictus*) zich niet in Nederland hebben gevestigd.<sup>34,35</sup>

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met het gg-Denguevirus kandidaatvaccin. De vergunningaanvraag bevat echter een zeer summiere beschrijving van de werkzaamheden, wat de advisering over de inschaling van de werkzaamheden met het tetravalente kandidaatvaccin bemoeilijkt. Zo zijn de werkzaamheden niet duidelijk gespecificeerd door de aanvrager, anders dan “het bepalen van de samenstelling van een levend ggo-vaccin (‘potency’, ‘sterility’,

‘identity’, virustiterbepalingen, etc.)”. Uit de beschrijving is niet af te leiden of de vaccinstammen ook (verder) genetisch gemodificeerd zullen worden, wat de stammen mogelijk virulenter zou maken.

Het is ook onbekend welke cellijnen door de aanvrager gebruikt zullen worden voor bijvoorbeeld de titerbepalingen. Hoewel flavivirussen niet bekend staan om hoge recombinatiefrequenties, is recombinatie tussen flavivirussen niet geheel uitgesloten. Om recombinatie uit te sluiten, adviseert de COGEM om alleen gebruik te maken van cellen die vrij zijn van (replicerende) flavivirussen. De COGEM merkt in dit verband op dat sommige muggencellijnen insect-specifieke flavivirussen bevatten.<sup>36,37</sup>

Omdat uit de beschrijving niet af te leiden is of de vaccinstammen ook (verder) genetisch gemodificeerd zullen worden, maakt de COGEM bij de inschaling onderscheid tussen werkzaamheden waarbij geen genetische modificatie van de stammen zal plaatsvinden, en werkzaamheden waarbij dat wel het geval is.

De COGEM is van oordeel dat de werkzaamheden met het tetravalente kandidaatvaccin, bestaande uit de vaccinstammen rDENV1Δ30, rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 en rDENV4Δ30, op ML-I kunnen plaatsvinden, mits de stammen onveranderd blijven. Werkzaamheden waarbij wel sprake is van genetische modificatie van de vaccinstammen, dienen te worden uitgevoerd op ML-II. In alle gevallen geldt dat de volgende aanvullende maatregel zal moeten worden genomen:

- De gebruikte cellen moeten vrij zijn van verwante (replicerende) flavivirussen om te voorkomen dat de verwijderde sequenties kunnen worden hersteld door recombinatie.

Wanneer aan de bovengenoemde voorwaarde voldaan wordt, acht de COGEM de milieurisico's van het uitvoeren van werkzaamheden met het tetravalente Denguevirusvaccin op de betreffende inperkingsniveaus verwaarloosbaar klein.

## **8. Signalering**

De COGEM signaleert dat vanuit Arbo-overwegingen eventueel aanvullende maatregelen, die toegesneden zijn op de besmettingsroute van DENV, genomen moeten worden bij werkzaamheden met het kandidaatvaccin om onbedoelde besmetting van de medewerker te voorkomen. Hierbij kan gedacht worden aan het dragen van handschoenen en het beperken van het gebruik van ‘sharps’ om prikaccidenten te vermijden.

## **Referenties**

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).  
[https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202203081](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203081) (bezocht: 3 juli 2023)
2. Centers for Disease Control and Prevention. About Dengue.  
<https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>. (bezocht 3 juli 2023)

3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Flaviviridae. <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>. (bezocht 3 juli 2023)
4. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. (bezocht: 3 juli 2023)
5. World Health Organisation. Dengue and severe dengue. [Dengue and severe dengue \(who.int\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue) (bezocht: 3 juli 2023)
6. Sarker A *et al.* (2023). Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement. *Front. Immunol.* 14: 1200195
7. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
8. Harapan H *et al.* (2020). Dengue: a minireview. *Viruses* 12: 829
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. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
11. Blaney JE Jr *et al.* (2006). Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol.* 19: 10-32
12. Markoff L. (2003). 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res.* 59: 177-228
13. Alvarez DE *et al.* (2005). Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339: 200-212
14. Blaney JE Jr *et al.* (2008). Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. *Vaccine* 26: 817-828
15. Whitehead SS *et al.* (2003). Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine* 21: 4307-4316
16. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA-virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
17. Durbin AP. (2020). Historical discourse on the development of the live attenuated tetravalent dengue vaccine candidate TV003/TV005. *Curr. Opin. Virol.* 43: 79-87
18. Whitehead SS *et al.* (2003). A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J. Virol.* 77: 1653-1657
19. Hanley KA (2004). Introduction of mutations into the non-structural genes or 3' untranslated region of an attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate further decreases replication in rhesus monkeys while retaining protective immunity. *Vaccine* 22: 3440-3448
20. Blaney JE *et al.* (2002). Genetic basis of attenuation of dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells. *Virology* 300: 125-139.
21. Kirkpatrick BD *et al.* (2015). Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to healthy, flavivirus-naïve adults. *J. Infect. Dis.* 212: 702-710



22. Kirkpatrick BD *et al.* (2016). The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci. Transl. Med.* 8: 330ra36
23. Kallas EG *et al.* (2020). Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 20: 839-850.
24. Russell KL *et al.* (2022). A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability, and immunogenicity of a live-attenuated quadrivalent dengue vaccine in flavivirus-naïve and flavivirus-experienced healthy adults. *Hum. Vaccin Immunother.* 18: 2046960:
25. Holmes EC *et al.* (1999). Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 16: 405-409
26. Uzcatogui NY *et al.* (2001). Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J. Gen. Virol.* 82: 2945-2953
27. Twiddy SS & Holmes EC (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol.* 84: 429-440
28. Hu PY *et al.* (2013). Spatiotemporal dynamics and epistatic interaction sites in dengue virus type 1: a comprehensive sequence-based analysis. *PLoS One.* 8: e74165
29. Behura SK & Severson DW (2013). Nucleotide substitutions in dengue virus serotypes from Asian and American countries: insights into intracodon recombination and purifying selection. *BMC Microbiol.* 13, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-37>
30. Bai Z *et al.* (2018). Evolutionary and phylodynamic analyses of Dengue virus serotype I in Guangdong Province, China, between 1985 and 2015. *Virus Res.* 256: 201-208
31. Waman VP *et al.* (2017). Genetic diversity and evolution of dengue virus serotype 3: A comparative genomics study. *Infect. Genet. Evol.* 49: 234-240
32. Troyer JM *et al.* (2001). A live attenuated recombinant dengue-4 virus vaccine candidate with restricted capacity for dissemination in mosquitoes and lack of transmission from vaccinees to mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 414-419
33. Gubler DJ. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol Rev.* 11: 480-96
34. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Gelekoortsmug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knuten-en-teken/gelekoortsmug> (bezocht 11 juli 2023)
35. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Aziatische tijgermug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knuten-en-teken/aziatische-tijgermug> (bezocht 11 juli 2023)
36. Walker T *et al.* (2014). Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit. Vectors* 7: 382
37. Göertz GP *et al.* (2019). Mosquito Small RNA Responses to West Nile and Insect-Specific Virus Infections in *Aedes* and *Culex* Mosquito Cells. *Viruses* 11: 271