

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

DATUM 27 juli 2023
KENMERK CGM/230727-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met gg-denguevirus en cellen en dieren

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag (IG 23-112_2.8-000) met als titel 'Risk group classification of a attenuated genetically modified Dengue virus' van het LUMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde (gg-) Denguevirus rDEN2Δ30-7169. In dit gg-virus zijn 30 nucleotiden uit de 3' UTR van het genoom verwijderd waardoor de virale replicatie is aangetast, en is een aanvullende mutatie ontstaan na passage in cellen. rDEN2Δ30-7169 blijkt verzwakt te zijn in muizen, apen en mensen ten opzichte van het wildtype virus. De aanvrager verzoekt daarom werkzaamheden met rDEN2Δ30-7169 in cellen en dieren op inperkingsniveau II uit te mogen voeren.

Na infectie van mensen met rDEN2Δ30-7169 worden geen ernstige bijwerkingen gerapporteerd, maar wel aanhoudende viremie en andere milde tot matige klinische symptomen. Hoewel rDEN2Δ30-7169 verzwakt is ten opzichte van het wildtype virus, is de mate van verzwakking minder dan voor dengue-vaccinstammen. In klinische studies wordt het gg-virus daarom toegepast als 'challenge', om de effectiviteit van dengue vaccins te testen. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat rDEN2Δ30-7169 zich verder zou kunnen verspreiden naar derden via muggen, vanwege de verminderde replicatie in muggen en het feit dat de natuurlijke vectoren (bepaalde muggensoorten) zich niet in Nederland hebben gevestigd. De COGEM adviseert de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met rDEN2Δ30-7169 op ML-II en DM-II te laten plaatsvinden, met inbegrip van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op deze inperkingsniveaus, en onder navolging van 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.

- 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 zijn de COGEM-leden prof. dr. R.C. Hoeben en dr. M.C.W. Felkamp niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde denguevirus rDEN2Δ30-7169

COGEM advies CGM/230727-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor de omlaagschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-), geattenuerd denguevirus (DENV). De aanvraag is afkomstig van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC, IG 23-112). Het gg-DENV in de onderhavige aanvraag betreft rDEN2Δ30-7169, waarbij 30 nucleotiden in de 3' 'untranslated region' (UTR) gedeleteerd zijn, en een basensubstitutie aanwezig is in de sequentie coderend voor het NS4B-eiwit. De aanvrager stelt dat rDEN2Δ30-7169 geattenuerd is ten opzichte van wildtype DENV en vraagt een omlaagschaling aan naar ML-II en DM-II voor *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met dit gg-DENV.

2. Denguevirus (DENV)

DENV (species *Orthoflavivirus denguei*, genus *Orthoflavivirus*, familie *Flaviviridae*)¹ 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.² Er zijn vier serotypen DENV (serotype 1, 2, 3 en 4) die alle vier onder dezelfde soort worden geschaard.³ 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).⁴ 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.^{2,4} Geschat wordt dat er 100 tot 400 miljoen DENV-infecties per jaar optreden.⁵ 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.⁶

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.⁵

DENV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom van circa 11 kb, dat is omhuld door een lipidemembraan.^{7,8} 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 UTR.^{8,9} 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.^{3,7,8} 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.⁷ De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA-replicatie en de verwerking van het polyproteïne.^{3,7,8,10} De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheer cel, waarbij afsnoering (‘budding’) via het ER-membraan optreedt.¹⁰

3. DENV stam rDEN2Δ30-7169

Het gg-denguevirus rDEN2Δ30-7169 (vaak als rDEN2Δ30 aangehaald in de literatuur) is verkregen door een volledige cDNA-kloon van het DENV-2 isolaat Tonga/74 te construeren,¹¹ waarin 30 nucleotiden in de 3’UTR gedeleteerd zijn en een basesubstitutie aanwezig is op positie 7169 (U naar C) in de sequentie coderend voor NS4B.¹² Hierdoor is een aminozuurverandering van valine naar alanine ontstaan. Door de deletie in de 3’-UTR is een sterk geconserveerde stemloop-structuur die geassocieerd is met de virale replicatie, aangetast.¹³ De mutatie in NS4B maakt het mogelijk het gg-virus te verkrijgen (‘recovery’) vanuit zowel C6/36-cellen (cellen afkomstig van de muggensoort *Ae. albopictus*) en Vero-cellen mogelijk; zonder deze mutatie was dit alleen mogelijk in C6/36 cellen.¹²

4. Werkzaamheden met het gg-denguevirus

De uitvoerder is voornemens cellen en dieren te infecteren met rDEN2Δ30-7169. De *in vitro* infectie-experimenten zullen worden uitgevoerd met Huh-7 (‘human hepatoma’) en Vero (groene meerkat)-cellen. Voor de *in vivo* infectie-experimenten worden NOD-SCID (immuungecompromitteerde) muizen geïnfecteerd met rDEN2Δ30-7169. Cellen en weefsels afkomstig van de geïnfecteerde dieren zullen vervolgens verder geanalyseerd worden. De aanvrager verzoekt de laboratoriumwerkzaamheden op ML-II en handelingen met muizen op DM-II plaats te laten vinden, waarbij aanvullende voorschriften gehanteerd zullen worden zoals die gelden voor activiteiten met ggo’s die via wondjes overgedragen kunnen worden (op ML-II en DM-II). Op ML-II zullen tijdens de werkzaamheden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding worden gedragen, en open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) worden uitgevoerd. Op DM-II zullen, naast de standaardvoorschriften voor activiteiten met kleine zoogdieren in associatie met gg-virussen (zoals het gebruik van filtertopkooien en uitvoeren van open handelingen in een VK-II), eveneens handschoenen tot over de mouw worden gedragen.

5. Eerder COGEM advies

DENV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁴ De COGEM heeft recent geadviseerd over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met een tetravalent gg-denguevaccin.¹⁵ Dit gg-kandaatvaccin bevat vier DENV-vaccinstammen, afgeleid van elk van de vier serotypen: rDENV1Δ30, rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 en rDENV4Δ30. De vaccinstammen bevatten alle dezelfde deletie van 30 nucleotiden in de 3’-UTR, eender aan het gg-DENV uit onderhavige aanvraag. De chimere stam rDENV2/4Δ30(ME) is als basis de rDENV4Δ30 stam, waarbij de (pr)M- en E-genen zijn uitgewisseld met de overeenkomstige genen van serotype 2. rDENV3Δ30/31 bevat een additionele deletie van 31 nucleotiden in de 3’UTR, ‘upstream’ van de 30 nt deletie. De COGEM achtte het kandidaatvaccin geattenuëerd ten opzichte van wildtype DENV, en achtte de kans verwaarloosbaar klein dat dit gg-

kandidaatvaccin zich 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. Omdat uit de beschrijving van de werkzaamheden niet af te leiden was of de vaccinstammen (verder) genetisch gemodificeerd zullen worden, heeft de COGEM geadviseerd werkzaamheden met de onveranderde stammen op ML-I uit te voeren. Wanneer er wel sprake is van genetische modificatie van de vaccinstammen, dienen werkzaamheden te worden uitgevoerd op ML-II. Zowel op ML-I als ML-II heeft de COGEM geadviseerd dat de gebruikte cellen vrij moeten zijn van verwante (replicerende) flavivirussen.

6. Overweging

De aanvrager verzoekt een omlaagschaling van inperkingsniveau III naar II voor werkzaamheden met rDEN2Δ30-7169. De aanvrager stelt dat rDEN2Δ30-7169 geattenuëerd is ten opzichte van wildtype DENV op basis van verminderde infectiositeit in muggen, verminderde replicatie in immuun-gecompromitteerde (SCID) muizen waarin Huh-7 cellen getransplanteerd zijn (SCID-Huh-7 muizen), verminderde viremie in rhesusapen, en het uitblijven van dengue-achtige symptomen in klinische studies met dit gg-DENV. De uitvoerder verzoekt daarom een inschaling op ML-II voor infectiewerkzaamheden van cellen met gg-DENV en analyse van geïnfecteerde cellen of weefsels vanuit het dierverslijf, en op DM-II voor infectie van muizen. Hierbij zullen aanvullende voorschriften worden gehanteerd zoals gelden voor activiteiten met ggo's die infectieus zijn via wondjes van de huid.

6.1 Pathogeniteit van rDEN2Δ30-7169

Het rDEN2Δ30-7169 is afgeleid van Tonga/74, een isolaat waarvan bekend is dat deze een relatief milde uitbraak van dengue heeft veroorzaakt in Tonga, een eilandengroep in Polynesië.¹¹ Het gg-denguevirus rDEN2Δ30-7169 is in verschillende (pre)klinische studies onderzocht. Uit onderzoek waarbij SCID-Huh-7 muizen geïnoculeerd zijn met rDEN2Δ30-7169, bleek de replicatie van rDEN2Δ30-7169 tien keer lager te zijn (ongeveer 5 log₁₀ 'plaquevormende eenheden' (PFU)/ml) dan van het wildtype DENV-2 (Tonga/74, ongeveer 6 log₁₀ PFU/ml).¹² Bij toediening van rDEN2Δ30-7169 aan rhesusapen werd een verminderde viremie waargenomen in vergelijking met wildtype DENV-2. De afname in viremie was echter minder groot dan eerder geobserveerd voor stammen van andere serotypen die op vergelijkbare manier waren gemodificeerd (rDEN1Δ30 en rDEN4Δ30). Bij deze geattenuëerde stammen ontwikkelden 50% van de apen viremie, die gemiddeld 1 dag aanhield en waarbij de maximale virustiter in serum minder dan 1 log₁₀ PFU/ml betrof. Toediening van rDEN2Δ30-7169 resulteerde in 100% van de apen in viremie, die gemiddeld 2,8 dagen aanhield met een titerpiek van 1,7 log₁₀ PFU/ml, dat niet veel verschilt van de titerpiek die bereikt wordt na toediening van wildtype DENV-2 (2,1 log₁₀PFU/ml).¹²

Vanwege de consistente viremie en relatief hoge bloediters na toediening van rDEN2Δ30-7169 in rhesusapen, is rDEN2Δ30-7169 eerder afgefallen in de zoektocht naar de ideale denguevaccin-kandidaat, maar de stam bleek wel geschikt voor gebruik in een 'Dengue human infection model' (DHIM) in klinische studies.^{16,17,18,19,20,21,22} Hierbij wordt rDEN2Δ30-7169 als 'challenge' stam toegediend om de effectiviteit van ander vaccins te toetsen. In proefpersonen die rDEN2Δ30-7169

toegediend krijgen, wordt in 100% van de gevallen viremie gerapporteerd, die ongeveer 6 dagen aanhoudt, met een gemiddelde bloedtiter piek van 2,3-2,5 log₁₀PFU/ml. Daarnaast worden verschillende bijwerkingen gerapporteerd, voornamelijk maculopapulaire uitslag (80% van de proefpersonen), neutropenie (een tekort aan neutrofiële granulocyten, 20%), en trombocytopenie (tekort aan bloedplaatjes, 10%), met een mild tot matig klinisch verloop.^{16,19} Ernstigere dengue-achtige symptomen, gedefinieerd als aanhoudende koorts ($\geq 38,4$ °C voor ≥ 48 uur) en twee of meer van de symptomen hoofdpijn, spierpijn, retro-orbitale pijn, gewrichtspijn of erythemateuze uitslag, zijn niet waargenomen.¹⁶

Alles overwegende is de COGEM van oordeel dat rDEN2 Δ 30-7169 geattenuerd is ten opzichte van wildtype DENV-2, maar nog wel milde tot matige klinische symptomen kan veroorzaken in mensen.

6.2 Recombinatie en stabiliteit van rDEN2 Δ 30-7169

In het gg-denguevirus rDEN2 Δ 30-7169 zijn 30 nucleotiden uit de 3'-UTR van het genoom verwijderd. Door de deletie is een sterk geconserveerde stemloop-structuur aangetast die belangrijk is voor de replicatie van het DENV-genoom. Daarnaast heeft na passage in Vero-cellen een nucleotidesubstitutie plaatsgevonden op positie 7169 in de sequentie coderend voor het NS4B-eiwit. Het is bij de COGEM niet bekend of de mutatie in het NS4B gen voor extra attenuatie zorgt, of dat het een aanpassing aan het passeren in de cellijn betreft. De aanvrager levert geen specifieke gegevens aan met betrekking tot de stabiliteit van rDEN2 Δ 30-7169. De COGEM is van oordeel dat grote deleties in het RNA-genoom lastiger te herstellen zijn en dat de attenuering daarmee stabiel is dan wanneer het virus door de aanwezigheid van puntmutaties is geattenuerd. De Δ 30 deletie in de 3'-UTR betreft een RNA-structuur die ook upstream voorkomt. In theorie zou door duplicatie van de upstream RNA structuur de deletie in de 3'-UTR gerepareerd kunnen worden, maar dit is nooit waargenomen. Tevens worden er al enige tijd verscheidene Δ 30 DENV-varianten, waaronder rDEN2 Δ 30-7169, onderzocht in het kader van de vaccinontwikkeling, en herstel van de 3'UTR deletie is niet gerapporteerd. De COGEM is derhalve van oordeel dat de deletie in de 3'-UTR van rDEN2 Δ 30-7169 genetisch stabiel is en dat de kans verwaarloosbaar klein is dat dit gg-DENV zal reverteren naar wildtype DENV.

Met betrekking tot mogelijke recombinatie merkt de COGEM op dat recombinatie weinig optreedt bij flavivirussen, maar dat er wel gevallen van recombinatie van DENV zijn beschreven.^{23,24,25,26,27,28,29} De kans dat recombinatie van rDEN2 Δ 30-7169 met wildtype DENV zal optreden in een onbedoeld geïnfecteerde medewerker acht de COGEM verwaarloosbaar klein, omdat DENV niet van nature in Nederland voorkomt. Aangezien recombinatie tussen flavivirussen niet geheel uitgesloten is, acht de COGEM het van belang dat de gebruikte cellijnen en muizen vrij zijn van (replicerende) flavivirussen.

6.3 Transmissie van rDEN2 Δ 30-7169

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.⁵ DENV kan zich niet via aerosolen verspreiden.

COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat de verspreidingsroute van rDEN2Δ30-7169 veranderd is in vergelijking met wildtype DENV.

Uit onderzoek in muggen blijkt dat rDEN2Δ30-7169 niet efficiënt overgedragen kan worden vanuit de mens naar *Ae. aegypti*, een belangrijke vector voor DENV transmissie. rDEN2Δ30-7169 werd niet gedetecteerd in het hoofd of de middendarm van *Ae. aegypti*, 21 dagen na het voeden met een geïnfecteerd bloedmaal. Ook de wildtype stam DENV2 Tonga/74 was niet in staat de middendarm te infecteren.¹² Infectie van de muggensoort *Ae. albopictus* is in deze studie niet onderzocht.

De COGEM merkt op dat bij eventuele prikincidenten de blootstelling minimaal zal zijn. Daarnaast worden de natuurlijke vectoren van DENV, de Aziatische tijgermug en gelekoortsmug, weliswaar incidenteel aangetroffen in Nederland, maar deze worden bestreden en hebben zich niet in Nederland gevestigd.^{30,31} De COGEM is derhalve van oordeel dat de kans op transmissie van rDEN2Δ30-7169 van een eventueel besmette medewerker naar derden via muggen, verwaarloosbaar klein is.

7. Advies

Het rDEN2Δ30-7169 kan zich niet via aerosolen verspreiden. rDEN2Δ30-7169 is in verschillende klinische studies als ‘challenge’ virus gebruikt, waarbij geen ernstige bijwerkingen zijn gerapporteerd, maar wel aanhoudende viremie en andere milde tot matige klinische symptomen. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat rDEN2Δ30-7169 zich verder zou kunnen verspreiden naar derden via muggen, vanwege de verminderde replicatie in muggen en het feit dat de natuurlijke vectoren (*Ae. aegypti* of *Ae. albopictus*) zich niet in Nederland hebben gevestigd.^{30,31}

Hoewel flavivirussen niet bekend staan om hoge recombinatiefrequenties, is recombinatie tussen flavivirussen niet geheel uitgesloten. Om recombinatie uit te sluiten, acht de COGEM het van belang dat de bij de werkzaamheden gebruikte cellijnen (Vero en Huh-7) en proefdieren (NOD-SCID muizen) vrij zijn van (replicerende) flavivirussen.

De COGEM adviseert de *in vitro* werkzaamheden met gg-denguevirus rDEN2Δ30-7169 en de analyse van met rDEN2Δ30-7169-geïnfecteerd weefsel afkomstig van het dierverslijf, op ML-II te laten plaatsvinden, met inbegrip van de door de aanvrager voorgestelde maatregelen voor activiteiten met gg-micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid, i.e.:

- Tijdens werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden in een VK-II uitgevoerd.

Zij adviseert daarnaast ook als aanvullende maatregel te hanteren:

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

Met betrekking tot de *in vivo* werkzaamheden met gg-denguevirus rDEN2Δ30-7169, adviseert de COGEM een inschaling op DM-II, met inbegrip van de voorgenomen maatregelen voor activiteiten met

gg-micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid en activiteiten met kleine zoogdieren in associatie met gg-virussen, i.e.:

- De dieren zijn gehuisvest in filtertopkooien;
- Tijdens werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, worden in een VK-II uitgevoerd.

Zij adviseert daarnaast eveneens als aanvullende maatregel te hanteren:

- De gebruikte dieren 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 rDEN2Δ30-7169 op de betreffende inperkingsniveaus verwaarloosbaar klein.

8. Signalering Arbo-overwegingen

De COGEM signaleert dat vanuit Arbo-overwegingen eventueel aanvullende maatregelen, die toegesneden zijn op de besmettingsroute van DENV, genomen moeten worden bij werkzaamheden met rDEN2Δ30-7169 om onbedoelde besmetting van de medewerker te voorkomen. Hierbij kan gedacht worden aan het beperken van het gebruik van 'sharps' om prikaccidenten te vermijden. De COGEM merkt tevens op dat wanneer een medewerker onbedoeld blootgesteld wordt aan rDEN2Δ30-7169 en vervolgens een tweede infectie meemaakt door DENV serotype 1, 3 of 4, de kans op 'dengue haemorrhagic fever', of 'dengue shock syndrome' verhoogd wordt door het ADE-mechanisme.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 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. Gubler DJ *et al.* (1978). Epidemiologic, clinical and virologic observations on dengue in the kingdom of Tonga. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 581-589
12. Blaney JE (2004). Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect. Dis.* 4: 39
13. Blaney JE *et al.* (2006). Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol.* 19: 10-32
14. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA-virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
15. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd tetravalent Denguevirusvaccin. COGEM advies 230718-01
16. Larsen CP (2015). Dengue human infection models to advance dengue vaccine development. *Vaccine* 33: 7075-7082
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. Hou R *et al.* (2022). The innate immune response following multivalent dengue vaccination and implications for protection against dengue challenge. *JCI Insight* 7: e157811
19. 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
20. Nivarthi UK *et al.* (2021). A tetravalent live attenuated dengue virus vaccine stimulates balanced immunity to multiple serotypes in humans. *Nat. Commun.* 12: 1102
21. Grifoni A *et al.* (2017). Patterns of cellular immunity associated with experimental infection with rDEN2Δ30 (Tonga/74) support its suitability as a human dengue virus challenge strain. *J. Virol.* 91: e02133-16
22. Durbin AP *et al.* (2011). Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine* 29: 7242-7250
23. Holmes EC *et al.* (1999). Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 16: 405-409
24. 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
25. Twiddy SS & Holmes EC (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol.* 84: 429-440
26. 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
27. 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>

28. 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
29. Waman VP *et al.* (2017). Genetic diversity and evolution of dengue virus serotype 3: A comparative genomics study. *Infect. Genet. Evol.* 49: 234-240
30. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Gelekoortsmug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knutten-en-teken/gelekoortsmug> (bezocht 11 juli 2023)
31. Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Aziatische tijgermug. <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/muggen-knutten-en-teken/aziatische-tijgermug> (bezocht 11 juli 2023)