

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

DATUM 20 juli 2017
KENMERK CGM/170720-01
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met *gg-Zikavirus en gg-Yellow fever virus* in associatie met muggen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van een bestaande vergunning (IG 15-194_2.8-000) getiteld: 'Genetisch gemodificeerde virussen (WNV, CHIKV) met "loss of function" puntmutaties' ingediend door Wageningen University, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (*gg-Zika virus (ZIKV)* en *gg-Yellow fever virus (YFV)*) in associatie met de muggensoorten *Aedes aegypti* (gele koortsmug) en *Culex pipiens* (gewone steekmug).

ZIKV en YFV zijn virussen die ernstige ziektebeelden bij mensen kunnen veroorzaken en doorgaans via muggen worden overgedragen. Transmissie van ZIKV kan ook plaatsvinden van moeder op kind tijdens de zwangerschap, en door middel van seksueel contact. YFV veroorzaakt gele koorts, een ernstige tropische infectieziekte, die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop heeft. Een effectief vaccin is beschikbaar voor YFV, maar niet voor ZIKV.

De COGEM is van oordeel dat de genetische modificaties die de aanvrager wil aanbrengen, zullen resulteren in verzwakking van zowel ZIKV als YFV. De COGEM stemt ermee in om werkzaamheden met beide *gg-virussen* op ML-III niveau uit te voeren in combinatie met een aantal additionele inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften die identiek zijn aan de maatregelen en voorschriften uit een eerder COGEM advies over *gg-West Nile virus* en *gg-Chikungunya virus* in associatie met muggen. Tevens stemt de COGEM in met het voorstel om medewerkers die zwanger zijn uit te sluiten van werkzaamheden met *gg-ZIKV*.

Op dit inperkingsniveau en met in achtneming van deze aanvullende voorschriften, is de COGEM van oordeel dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

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

Inschaling van werkzaamheden met gg-Zikavirus en gg-Yellow fever virus in associatie met muggen

COGEM advies CGM/170720-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging van een bestaande vergunning (IG 15-194) aangaande de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg)-Zikavirus (ZIKV) en gg-Yellow fever virus (YFV). De aanvrager is van plan gg-ZIKV en gg-YFV te produceren, en vervolgens de muggensoorten *Culex pipiens* en *Aedes aegypti* met deze gg-virussen te infecteren. De aanvrager vraagt om de werkzaamheden met gg-ZIKV en gg-YFV in associatie met deze muggensoorten uit te voeren op ML-III niveau met inachtneming van een aantal aanvullende voorschriften. Werkzaamheden met gg-West Nile virus (WNV) en gg-Chikungunya virus (CHIKV) in associatie met muggen, die onder dezelfde vergunning vallen (IG 15-194), zijn met in acht name van dezelfde inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften al vergund.

2. Flavivirussen

Zowel ZIKV als YFV zijn positief enkelstrengs RNA-virussen, die behoren tot de familie *Flaviviridae* en het genus *Flavivirus*.^{1,2} Het genomisch RNA van flavivirussen codeert voor één enkel polyproteïne en wordt aan weerszijden geflankeerd door een non-coding region ofwel non-translated region (NTR).^{1,2,3} 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.

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 een cel. De NS-genen en de 5'- en 3'-NTRs zijn betrokken bij translatie, replicatie en het inpakken van het RNA in het virusdeeltje. De NS-genen coderen voor helicase, polymerase en protease.^{1,2} Virusreplicatie lijkt zowel in de celkern als in autofagosomen in het cytoplasma plaats te vinden.^{4,5} Indien er geen NTRs aanwezig zijn of wanneer deze gemuteerd zijn, dan vindt er geen replicatie van het virusgenoom plaats.

2.1 Zikavirus

ZIKV is voor het eerst in 1947 in Oeganda geïsoleerd bij non-humane primaten. Het virus is in 1952 voor het eerst aangetroffen bij de mens en is endemisch in Afrika en Azië.^{6,7} Er worden drie klonale lijnen onderscheiden: de Oost-Afrikaanse, de West-Afrikaanse en de Aziatische.^{8,9,10,11}

In 2007 en 2013 heeft ZIKV een epidemie veroorzaakt in Oceanië en Gabon (Afrika).^{12,13,14,15} In maart 2015 is voor het eerst melding gemaakt van de aanwezigheid van ZIKV in Brazilië.¹⁶ Momenteel is in Midden- en Zuid-Amerika een ZIKV-epidemie gaande.¹⁷ Deze epidemie wordt veroorzaakt door een virus dat is geëvolueerd uit de Aziatische lijn, en verwant is aan het virus dat de epidemieën in Oceanië heeft veroorzaakt.^{6,9,17,18}

Een ZIKV infectie verloopt doorgaans asymptomatisch, maar kan ook een milde ziekte veroorzaken die 3 tot 12 dagen duurt. Eén op de vier patiënten vertoont ziekteverschijnselen,

waaronder (hoge) koorts, hoofdpijn, gewrichtspijn en huiduitslag. De ziekteverschijnselen lijken op die van griep, dengue en chikungunya.^{7,12}

Op basis van de gegevens van de huidige ZIKV-epidemie in Zuid- en Midden-Amerika zijn er aanwijzingen dat een doorgemaakte ZIKV-infectie afwijkingen kan veroorzaken aan het centrale zenuwstelsel bij foetussen en pasgeborenen.^{19,20,21,22,23} Dit kan resulteren in een miskraam. ZIKV-RNA is ook in het hersenweefsel van foetussen en pasgeborenen met microcefalie aangetroffen.^{19,20,22,24,25,26} Tevens lijkt er een correlatie te bestaan tussen een doorgemaakte ZIKV-infectie en het Guillain Barré Syndroom (GBS), een neuromusculaire verlamming die ontstaat doordat het afweersysteem het zenuwstelsel aanvalt.^{27,28}

Naast overdracht van ZIKV door muggen, is overdracht van moeder op kind mogelijk tijdens de zwangerschap^{19,20,22} of rondom de bevalling.²⁵ Er zijn tevens aanwijzingen dat ZIKV seksueel overdraagbaar is.^{29,30}

Momenteel is er geen geneesmiddel of vaccin tegen ZIKV beschikbaar. De behandeling van patiënten bestaat uit symptoombestrijding.

2.2 Yellow fever virus

YFV veroorzaakt gele koorts, een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika ten zuiden van de Sahara en in Zuid-Amerika, maar ook kan worden overgebracht op mensen via muggen. Symptomen van gele koorts bij de mens zijn koorts, hoofdpijn, rugpijn, misselijkheid, geelzucht en stoornissen in de nierfunctie. Daarbij kunnen ook bloedingen in de mond en in de darmen optreden. Gele koorts is een ernstige ziekte die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop heeft.³¹ Een effectieve langdurige bescherming is mogelijk door vaccinatie met de levend verzwakte YFV vaccinstam YF-17D. YF-17D is afgeleid van de wildtype YFV-Asibi stam en is 75 jaar geleden ontwikkeld. Miljoenen mensen zijn met YF-17D gevaccineerd. De attenuering van deze vaccinstam wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door een aantal mutaties in het membraan eiwit E.³²

3. Muggen

ZIKV en YFV, beide arbovirussen, worden via verschillende muggensoorten overgedragen. *Aedes aegypti* (gele koortsmug) en *Aedes albopictus* (Aziatische tijgermug) zijn de belangrijkste transmissie-vectoren van beide virussen.^{13,33,34,35} Daarnaast is het aannemelijk dat *Aedes hensilli* ZIKV kan overdragen.^{12,36} Van veel andere muggensoorten is bekend dat zij ZIKV bij zich hebben, maar onbekend is of ze het virus daadwerkelijk kunnen overbrengen.^{8,36,37,38,39} De gele koortsmug zuigt voornamelijk bloed bij mensen. Deze muggensoort kan zich in Nederland niet handhaven, maar wordt net als de Aziatische tijgermug incidenteel geïmporteerd in Nederland.⁴⁰ De Aziatische tijgermug is waarschijnlijk wel in staat om de Nederlandse winters te overleven. *Aedes hensilli* is vooralsnog nooit in Nederland aangetroffen.

De aanvrager is voornemens bij zijn werkzaamheden gebruik te maken van de muggensoorten *A. aegypti* en *Culex pipiens*. Deze laatste muggensoort, ook wel de gewone steekmug genoemd, is een zeer algemene soort in Nederland.⁴¹ *C. pipiens* heeft een voorkeur voor het bloed van vogels, maar zuigt ook bloed bij mensen. De muggen overwinteren op beschutte plaatsen, vaak in gebouwen, of in kelders of holen.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft ZIKV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3, en geadviseerd om werkzaamheden met gg-ZIKV uit te voeren op ML-III niveau.⁴² De COGEM heeft YFV ook ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.⁴³ Een uitzondering hierop betreft de vaccinstam YFV-17D, welke is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁴⁴ De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-YFV en gg-ZIKV in associatie met muggen. Werkzaamheden met gg-WNV en gg-CHIKV in associatie met muggen, die vergelijkbaar zijn met de voorgenomen werkzaamheden in het onderhavige advies, zijn door de COGEM beide ingeschaald op ML-III niveau.⁴⁵

5. gg-ZIKV en gg-YFV

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met gg-ZIKV en gg-YFV en hiervan afgeleide mutanten met mutaties in het 3'UTR. De aanvrager verwacht dat de aangebrachte mutaties in het 3'UTR leiden tot attenuatie van ZIKV en YFV. Dit leidt de aanvrager af uit bevindingen van onderzoek met gg-WNV. Mutaties aangebracht in het 3'UTR van het RNA van dit flavivirus zorgden voor een verstoring van een belangrijke RNA structuur (stemloop). Door deze verstoring wordt de aanmaak verhinderd van een niet-coderend viraal RNA molecuul, sfRNA. Als gevolg van deze mutaties is gg-WNV geattenuëerd in zoogdiercellen en heeft gg-WNV een verminderde infectie van, en transmissie door *C. pipiens*.^{46,47}

6. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan om zowel volvirulent als gg-ZIKV en gg-YFV te infecteren in de muggensoorten *A. aegypti* en *C. pipiens*. Hierbij wil de aanvrager dezelfde inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften hanteren voor werkzaamheden met gg-ZIKV en gg-YFV in associatie met *C. pipiens* en *A. aegypti*, zoals reeds vergund is voor soortgelijke werkzaamheden met gg-WNV en gg-CHIKV (IG 15-194) en hieronder zijn weergegeven.

6.1 Handelingen met gg-ZIKV, gg-YFV en muggen

De muggen worden geïnfecteerd door een zogenaamde 'Hemotek feeder' met daarin infectieus kippenbloed op een kooitje met muggen te plaatsen. De muggen kunnen dan door het gaas en het parafilm membraan van de 'Hemotek feeder' heen het bloed tot zich nemen. De muggen worden gehouden in containers die zijn afgedekt met knuttengaas. Per container worden maximaal 50 muggen gehouden. Alleen wanneer dit nodig is voor het experiment, worden de muggen uit hun container gehaald. Dit gebeurt bij het sorteren van muggen, het injecteren van muggen met gg-virus en bij het verzamelen van muggenspeeksel. Muggen worden ook geïnfecteerd door injectie met gg-virus met behulp van een Nanoject II. Hierbij worden de muggen verdoofd met CO₂ voordat de container wordt geopend. De muggen liggen tijdens het injecteren van het gg-virus op een CO₂ pad om ervoor te zorgen dat ze verdoofd blijven.

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

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

6.2 Faciliteiten

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

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

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

6.3 Additionele veiligheidsmaatregelen

Naast bovenstaande inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften wil de aanvrager twee additionele maatregelen implementeren:

- Gezien ZIKV kan worden overgedragen door seksueel contact en van moeder op kind tijdens de zwangerschap, is de aanvrager voornemens om haar medewerkers over de mogelijke risico's van infectie met (gg-)ZIKV te informeren en wil zij haar medewerkers zelf de keuze laten maken of zij wel/niet met (gg-)ZIKV willen werken;
- Als aanvullende maatregel voor werkzaamheden met volvirulent YFV vereist de aanvrager van haar medewerkers dat zij worden ingeënt met het YFV-17D vaccin.

7. Overweging en advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd over werkzaamheden met gg-WNV en gg-CHIKV in associatie met muggen. Zij adviseerde dat werkzaamheden met deze virussen konden worden uitgevoerd op ML-III niveau, onder toepassing van de volgende aanvullende voorschriften:

- In de werkruimte en de sluis zijn geschikte vallen voor de muggen aangebracht;
- De handelingen vinden plaats met inachtneming van de protocollen zoals beschreven in de aanvraag;
- Open handelingen met muggen worden uitgevoerd in een insectendichte tent;
- Voorafgaand aan het openen van de insectenkooien worden de insecten geïmmobiliseerd met een gevalideerde methode. Tijdens de werkzaamheden worden de insecten met een gevalideerde

methode immobiel gehouden. Na afloop van de handelingen worden de insecten overgezet in een container die gesloten is, voordat de insecten mobiel worden;

- Bij aanvang en beëindiging van het experiment, voor opening van de container en na terugplaatsing van de muggen, worden alle levende en dode insecten geteld, met als doel vast te stellen dat er geen muggen zijn ontsnapt;
- Hoofdhaar, baard en/of snor (indien aanwezig) zijn met een haarkapje of iets vergelijkbaars afgedekt;
- Tijdens de beschreven open handelingen met gg-CHIKV, gg-WNV in de muggentent wordt een mond- en neuskapje, P2 of hogere specificatie, en een veiligheidsbril gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan onder condities waarbij prik- en snijaccidenten worden voorkomen (bijvoorbeeld in combinatie met kevlarhandschoenen).

Bij deze activiteiten kunnen de werkvoorschriften genoemd onder l, t en v van 9.1.1.4.2 (Bijlage 9 van de Regeling ggo) buiten toepassing blijven.

De aanvrager wil voor werkzaamheden met volvirulent en gg-ZIKV en gg-YFV in associatie met muggen dezelfde inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften hanteren als hierboven beschreven voor reeds vergunde werkzaamheden met gg-WNV en gg-CHIKV. De COGEM is van mening dat bovenstaande inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften ook van toepassing zijn voor werkzaamheden met gg-ZIKV en gg-YFV in associatie met muggen. Zij komt tot dit oordeel, omdat zij verwacht dat de aan te brengen mutaties in het 3'UTR voor zowel ZIKV als YFV tot attenuatie zal leiden, overeenkomstig met eerdere bevindingen met geattenuerd gg-WNV.^{46,47} De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat er, als gevolg van de aangebrachte mutaties, een virulenter virus gevormd wordt, of een virus dat een verhoogde efficiëntie heeft van infectie en transmissie in mens en mug. Mochten de aangebrachte mutaties niet leiden tot een verminderde aanmaak van het sterk geconserveerde sfRNA, dan wordt hoogstens een virus gevormd dat even virulent is als het wildtype virus. Omdat dezelfde inperkingsmaatregelen en werkvoorschriften gehanteerd worden voor werkzaamheden met wildtype ZIKV en YFV in associatie met muggen, acht zij deze maatregelen en voorschriften eveneens toereikend voor de voorgenomen werkzaamheden met gg-ZIKV en gg-YFV.

De COGEM stemt in met de maatregel van de aanvrager om medewerkers te vaccineren met het YFV-17D vaccin alvorens werkzaamheden met volvirulent YFV uit te voeren. Daarbij merkt de COGEM op dat vaccinatie in enkele gevallen niet leidt tot de vorming van een adequate virustiter.⁴⁸ Zij adviseert daarom om na vaccinatie de virustiter te bepalen en werkzaamheden pas te laten aanvangen met volvirulent YFV, indien een voldoende beschermingsgraad bij gevaccineerde medewerkers bereikt is.

Bij de werkzaamheden met gg-ZIKV acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein is dat de medewerkers met de ggo's geïnfecteerd zullen worden als deze werkzaamheden worden uitgevoerd op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften. Zij wijst er

echter op dat de gevolgen van een infectie voor een ongeboren kind zeer groot kunnen zijn. De COGEM stemt daarom in met het voorstel van de aanvrager om medewerkers met een kinderwens hierover goed in te lichten en hen nadrukkelijk zelf de keuze te laten of zij werkzaamheden met deze gg-ZIKV willen uitvoeren. Gezien het vermoeden dat ZIKV ook via seksuele transmissie overgedragen kan worden, acht zij dit niet alleen voor vrouwen maar ook voor mannen met een kinderwens van toepassing. Daarnaast stemt de COGEM in met het voorstel om zwangere vrouwen uit te sluiten van werkzaamheden met (gg-)ZIKV, vanwege de mogelijke overdraagbaarheid van ZIKV van moeder op kind tijdens de zwangerschap.

Referenties

1. Pierson TC & Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: Fields virology, volume 1, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. Simmonds P *et al.* (2012). Family Togaviridae. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Bredenbeek PJ *et al.* (2003). A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Vir.* 84: 1261-1268
4. Hamel R *et al.* (2015). Biology of *Zika virus* infection in human skin cells. *J. Virol.* 89: 8880-8896
5. Buckley A & Gould EA (1988). Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with *Zika* or *Langat virus*. *J. Gen. Virol.* 69: 1913-1920
6. Haddow *et al.* (2012). Genetic characterization of *Zika virus* strains: Geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1477
7. Ios S *et al.* (2014). Current *Zika virus* epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44: 302-307
8. Faye O *et al.* (2013). Quantitative real-time PCR detection of *Zika virus* and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol. J.* 10: 311-319
9. Baronti C *et al.* (2014). Complete coding sequence of *Zika virus* from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announcements* 2: e00500-14
10. Berthet N *et al.* (2014). Molecular characterization of three zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector-borne Zoonotic Dis.* 14: 862-865
11. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Rapid risk assessment. *Zika virus* epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 10 December 2015. Stockholm
12. Duffy MR *et al.* (2009). *Zika virus* outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360: 2536-2543
13. Grard G *et al.* (2014). *Zika virus* in Gabon (Central Africa) - 2007: A new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e2681
14. Cao-Lormeau V-M *et al.* (2014). *Zika virus*, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 1085-1086

15. Musso D *et al.* (2014). Rapid spread of emerging *Zika virus* in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: O595-O596
16. Campos GS *et al.* (2015). *Zika virus* outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 1885-1886
17. European Centre for Disease Prevention and Control (2016). Rapid risk assessment. *Zika virus* disease epidemic: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Third Update, 23 February 2016. Stockholm
18. Musso D (2015). *Zika virus* transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 1887
19. Mlakar J *et al.* (2016). *Zika virus* associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* DOI: 10.1056/NEJMoa1600651
20. Oliveira Melo OAS *et al.* (2016). *Zika virus* intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47: 6-7
21. Calvet G *et al.* (2016). Detection and sequencing of *Zika virus* from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
22. Centers for Disease Control and Prevention (2016). Notes from the field: Evidence of *Zika virus* infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65: 1-2
23. Sarno M *et al.* (2016). *Zika virus* infection and stillbirths: A case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. *PLoS Negl. Trop. Dis.* DOI:10.1371/journal.pntd.0004517
24. Musso D *et al.* (2015). Detection of *Zika virus* in saliva. *J. Clin. Virol.* 68: 53-54
25. Besnard M *et al.* (2014). Evidence of perinatal transmission of *Zika virus*, French Polynesia, December 2013 and February 2014. www.eurosurveillance.org
26. Musso D *et al.* (2014). Potential for *Zika virus* transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. www.eurosurveillance.org
27. Oehler E *et al.* (2014). *Zika virus* infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. www.eurosurveillance.org
28. 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)
29. Foy BD *et al.* (2011). Probable non-vector-borne transmission of *Zika virus*, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 880-882
30. Dallas County Health and Human Services (2016). Sexual transmission of *Zika virus*. www.dallascounty.org/department/hhs/documents/DCHHS_Zika_HealthAdvisory_20160202_final.pdf
31. Monath TP (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* 1: 11-20
32. Lee E & Lobigs M (2008). E protein domain III determinants of *Yellow Fever virus* 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* 82: 6024-6033
33. Li MI *et al.* (2012). Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to *Zika virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1792

34. Wong P-SJ *et al.* (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A potential vector of *Zika virus* in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2348
35. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Rapid risk assessment. Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. 24 November 2015. Stockholm
36. Ledermann JP *et al.* (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of chikungunya and zika viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3188
37. Grard G *et al.* (2010). Genomics and evolution of *Aedes*-borne flaviviruses. *J. Gen. Virol.* 91: 87-94
38. Diallo D *et al.* (2014). *Zika virus* emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE* 9: e109442
39. Diagne CT *et al.* (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit *Zika virus*. *BMC Infectious Dis.* 15: 492-498
40. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Aedes*. www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/search/nsr_search.php?search=Aedes (bezocht: 12 juli 2017)
41. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse Biodiversiteit. *Culex Pipiens*. http://www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/species/nsr_taxon.php?id=150624 (bezocht: 12 juli 2017)
42. COGEM (2016). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met (genetisch gemodificeerd) *Zika virus*. COGEM advies CGM/160307-01
43. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2017). COGEM advies CGM/170522-03
44. COGEM (2007). Evaluatie van een recombinant *Yellow fever virus* vaccin. COGEM advies CGM/070724-01
45. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus* en gg-*West Nile virus* in combinatie met muggen. COGEM advies CGM/150907-02
46. Pijlman GP *et al.* (2008). A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe.* 4: 579-591
47. Göertz GP *et al.* (2016). Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines *West Nile Virus* Transmission by *Culex pipiens* Mosquitoes. *J. Virol.* 90:10145-10159
48. Gotuzzo E *et al.* (2013). Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89: 434-444