

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

DATUM 30 juni 2016

KENMERK CGM/160630-01

ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* in combinatie met muggen en schapen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag 'Arbovirus onderzoek in associatie met muggen' (IG 16-114) van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (Lelystad), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Rift Valley fever virus* (RVFV) in combinatie met muggen en schapen. RVFV komt voor in Afrika en is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Het virus is ziekteverwekkend voor mensen en landbouwhuisdieren. Dieren worden hoofdzakelijk door muggen met het virus besmet. Bij mensen treedt besmetting voornamelijk via contacttransmissie of aerogene transmissie op. Ook is besmetting via muggen of steekvliegen mogelijk.

De aanvrager wil onderzoeken of de Nederlandse mug *Culex pipiens* met dit virus geïnfecteerd kan worden. Hij wil daartoe deze muggensoort kunstmatig voeden met bloed geïnfecteerd met volvirulent gg-RVFV of geïnfecteerd met een mutant die een deel van het virale genoom mist. Daarnaast wil de aanvrager *C. pipiens* voeden op schapen die geïnfecteerd zijn met volvirulent gg-RVFV. Vervolgens zal van de muggen speeksel afgenomen worden voor verdere analyse.

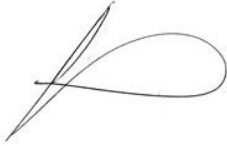
De aanvrager wil de laboratoriumwerkzaamheden met de muggen op ML-III inperkingsniveau en de werkzaamheden met muggen in combinatie met schapen op DM-III inperkingsniveau uitvoeren. Hij zal daarbij ook de aanvullende voorschriften hanteren die eerder door de COGEM bij vergelijkbare werkzaamheden zijn geadviseerd.

De COGEM kan instemmen met de door de aanvrager voorgenomen inperkingsniveaus en aanvullende voorschriften en is van mening dat, onder inachtneming van enkele additionele voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij 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 belangenverstrengelingen zijn de COGEM leden dr. T.G. Kimman en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* in associatie met muggen en schapen

COGEM advies CGM/160630-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (gg-RVFFV) in combinatie met muggen en schapen. Het betreft een vergunningaanvraag van de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek te Lelystad. De aanvrager wil onderzoeken of de Nederlandse steekmug geïnfecteerd kan worden met het RVFFV.

1.1 *Rift Valley fever virus* (RVFFV)

Het RVFFV virus is voor het eerst in 1931 geïdentificeerd bij schapen in de Rift vallei in Kenia. Inmiddels is bekend dat het virus endemisch is in verschillende Afrikaanse landen. In 2000 heeft het virus zich ook in enkele Arabische landen gemanifesteerd. RVFFV is primair infectieus voor landbouwhuisdieren (schapen, geiten, koeien en kamelen) wat kan leiden tot sterfte en grote economische schade. Tevens kan het virus mensen infecteren.^{1,2}

Bij mensen veroorzaakt het virus doorgaans griepachtige symptomen zoals koorts, hoofdpijn en spierpijn. Een klein deel van de patiënten (1%) ontwikkelt ernstigere verschijnselen zoals oogontsteking, hemorrhagische koorts of hersen- en ruggenmergontsteking.^{1,2} Bij dieren zijn vooral schapen vatbaar voor het virus. De mortaliteit onder volwassen schapen ten gevolge van een infectie met het RVFFV is ca. 10%. Bij lammeren overlijdt 90% aan de gevolgen van een RVFFV infectie. Als drachtige schapen worden geïnfecteerd, is de kans op spontane abortus bijna 100%.^{1,2}

Bij dieren wordt het virus voornamelijk verspreid door muggen, onder meer de soorten *Aedes sp.*, *Anopheles sp.* en *Culex sp.*^{1,3} In dierexperimenteel onderzoek is aangetoond dat het RVFFV ook zonder tussenkomst van vectoren tussen schapen overgedragen kan worden. De schapen bleken het virus via hun neus en oren uit te scheiden.⁴ Mensen worden voornamelijk met RVFFV besmet via (in)direct contact met bloed, weefsels of organen van geïnfecteerde dieren.^{1,2} Ook inhalatie van aërosolen die vrijkomen tijdens de slacht van geïnfecteerde dieren of tijdens laboratoriumwerkzaamheden kan leiden tot humane infecties.² Tevens zijn humane infecties door muggenbeten en steekvliegen gerapporteerd. Tot op heden is niet waargenomen dat het virus rechtstreeks van mens tot mens wordt overgedragen.²

1.2 *Genomische organisatie van RVFFV*

RVFFV is een enkelstrengs negatief RNA-virus dat behoort tot het genus *Phlebovirus* en de familie *Bunyaviridae*. Het genoom bestaat uit een 'small' (S), medium (M) en 'large' (L) segment.⁵ Het S-genoomsegment codeert voor het nucleocapside eiwit N. Dit eiwit vormt samen met de drie RNA-moleculen het zogenaamde 'nucleocapside'. Daarnaast codeert het S-genoomsegment voor het niet-structurele eiwit NSs. Dit eiwit speelt een belangrijke rol bij de virulentie doordat het de interferon- β productie in de gastheer onderdrukt.^{6,7,8,9,10,11} Het M-genoomsegment codeert voor het glycoproteïne voorloper-eiwit GPC dat na translatie gekliefd wordt in Gn en Gc en het niet-structurele eiwit NSm. De glycoproteïnen bevinden zich in het membraan van het virus, waardoor het virus aan

doelwitcellen kan binden.⁵ Het L-genoomsegment codeert voor het virale RNA polymerase L. Dit polymerase is verantwoordelijk voor RNA replicatie en mRNA synthese.⁵

Aan de 5' en 3' uiteinden van de genoomsegmenten van RVFV bevinden zich de zogenaamde 'untranslated regions' of UTRs. Per genoomsegment L, M en S zijn deze UTRs verschillend in lengte en nucleotidenvolgorde. De UTRs zijn essentieel voor replicatie van de genoomsegmenten en voor het inpakken van de genoomsegmenten in virusdeeltjes.⁵

2. Voorgenomen werkzaamheden en (werk)voorschriften

De aanvrager is van plan om te onderzoeken of de Nederlandse steekmug *Culex pipiens* met het RVFV geïnfecteerd kan worden. Daartoe zal hij *C. pipiens* gaan voeden met bloed dat geïnfecteerd is met verschillende gg-RVFV varianten (zie 2.1). De voedingsexperimenten zullen met behulp van een 'hemotek feeder' en via met virus geïnfecteerde schapen plaatsvinden (zie respectievelijk 2.3 en 2.4). Vervolgens zal voor verder onderzoek op meerdere momenten speeksel van de muggen afgenomen worden (zie 2.5). Dit speeksel zal onderzocht worden op de aanwezigheid van gg-RVFV. Indien gg-RVFV wordt aangetoond, zal vervolgens onderzocht worden óf en welke aminozuren van oppervlakte-eiwitten van gg-RVFV betrokken zijn bij infectie van *C. pipiens*.

2.1 gg-RVFV

De te gebruiken gg-virussen betreffen *in vitro* gegenereerde varianten van volvirulent gg-RVFV, en twee deletiemutanten van een geattenuerde RVFV mutant (RVFV-4S-ΔNS). Het volvirulente gg-RVFV wordt in zoogdiercellen geproduceerd. Hiertoe is het RVFV- genoom in de vorm van DNA-kopieën van de drie individuele genoomsegmenten over drie plasmiden verdeeld. Het betreft het genoom van wildtype virus en varianten hiervan, waarbij tevens een fluorescerend gen is geïnsereerd. Bij de deletiemutanten is het M-segment gesplitst in twee aparte genoomsegmenten en het virale genoom over vier plasmiden verdeeld waardoor het virusdeeltje in totaal vier genoomsegmenten bevat.¹² Bij de ene deletiemutant is het gen voor de virulentiefactor NSs geheel en bij de andere deletiemutant gedeeltelijk verwijderd.

2.2 Kweek van C. pipiens

De voor de experimenten te gebruiken *C. pipiens* muggen bevinden zich in BugDorm muggenkooien. De openingen van deze containers zijn afgesloten met knuttengaas. De muggen worden kunstmatig gevoed in met knuttengaas afgesloten voedingsemmertjes of in de muggenkooien. Emmertjes en containers worden in een klimaatkast geïncubeerd. Voor het uitvoeren van de experimenten worden de muggen uit de muggenkooien gevangen. Dit gaat met behulp van een zogenaamde 'pooter' ofwel aspirateur. Met dit apparaatje kunnen muggen (indien nodig per stuk) voorzichtig opgezogen worden en in de bijbehorende afgesloten unit worden opgevangen.

2.3 Kunstmatige voedingsexperimenten van C. pipiens met gg-RVFV geïnfecteerd bloed

Het kunstmatig voeden van *C. pipiens* zal plaatsvinden met behulp van een zogenaamde 'Hemotek feeder' waarin runderbloed met gg-RVFV (volvirulent of deletiemutant RVFV-4S-ΔNS) aanwezig is. De 'feeder' wordt op een muggenkooi of voedingsemmertje met muggen geplaatst waarna de muggen door het gaas van container of emmertje en door het parafilmembraan van de 'Hemotek feeder' heen

het bloed tot zich kunnen nemen. Na een bloedmaal wordt het voedingsemmertje in zijn geheel in een muggenkooi geplaatst en binnen deze kooi geopend, zodat de muggen het emmertje kunnen verlaten. Vervolgens worden de gevoede muggen van de niet gevoede muggen gescheiden door laatstgenoemden met de aspirateur te vangen en via de opvangunit van de aspirateur in een nieuwe muggenkooi losgelaten. Hiertoe wordt eerst de gehele opvangunit in de kooi gebracht en dan pas geopend. De niet-gevoede muggen worden door bevriezing gedood en als ML-III afval vernietigd.

2.4 Voedingsexperimenten van C. pipiens op (gg-)RVFV viremische schapen

Ten behoeve van de *in vivo* voedingsexperimenten zijn schapen geïnoculeerd met wildtype of volvirulent gg-RVFV. Op verschillende momenten worden voedingscontainertjes op de schapen aangebracht (één per schaap). Deze containertjes zijn helemaal omgeven door rekbaar tape zodat ze niet kunnen breken. Na maximaal één uur worden de containertjes van de schapen verwijderd en dubbel verpakt in UN3373 verpakking naar het ML-III lab getransporteerd. In het laboratorium worden de containertjes uit de verpakking gehaald en alle muggen verdoofd door CO₂ de containertjes in te laten stromen. Vervolgens worden op een poreus sectieplaatje met toestroom van CO₂ (een zogenaamde CO₂-‘pad’) de gevoede muggen van de niet gevoede muggen gescheiden en onder verdoving in aparte muggenkooien geplaatst.

2.5 Speekselafname (gg-)RVFV gevoede muggen

Van de met (gg-)RVFV geïnfecteerd bloed gevoede muggen zal op verschillende momenten speeksel worden afgenomen voor verdere analyse. Hiertoe worden de in de muggenkooi aanwezige muggen individueel met de aspirateur gevangen en in de opvangunit van de aspirateur verdoofd door hier CO₂ in te laten stromen. Als de mug verdoofd is, wordt deze op een CO₂-‘pad’ geplaatst zodat deze verdoofd blijft. Vervolgens wordt óf de mug geïmmobiliseerd door vleugeltjes en pootjes te verwijderen, óf de mug wordt overgebracht in een reageerbuisje waarin een wattenstaafje met holle schacht is geplaatst. De schacht van dit wattenstaafje steekt door de dop heen.

De geïmmobiliseerde muggen worden met hun probiscus (zuignuit) in een pipetpuntje met een kleine hoeveelheid suiker-serumoplossing geplaatst. Dit stimuleert de mug om speeksel uit te scheiden. Het vloeistof/speekselmengsel wordt vervolgens opgenomen in kweekmedium en (na incubatie) gebruikt voor virus-isolatie of PCR. Ook de muggenlijfjes worden met behulp van een stampertje vermalen en in kweekmedium opgelost. Na kort afdraaien in een centrifuge wordt het supernatant verzameld en gebruikt voor virus-isolatie of PCR.

De muggen in de reageerbuisjes worden na een periode van hongeren gevoed door in de holle schacht van het wattenstaafje een suiker-serumoplossing te druppelen. Het vloeistof/speekselmengsel wordt vervolgens overgebracht in kweekmedium en gebruikt voor virus-isolatie of PCR. De muggen worden daarna levend bewaard voor verder onderzoek.

3. Voorgenomen inperkingsniveaus en overige (werk)voorschriften

3.1 Laboratorium werkzaamheden met gg-RVfV al dan niet gecombineerd met muggen

Alle laboratoriumwerkzaamheden met gg-RVfV, zowel met volvirulent gg-RVfV als RVfV-4S-ΔNS, en al dan niet in associatie met *C. pipiens*, zullen plaatsvinden op ML-III inperkingsniveau. Alle open handelingen met gg-RVfV, zoals het infecteren van het runderbloed, het vullen van de 'hemotek feeder', handelingen met vloeistof/muggenspeekselmengsels en het oplossen van de muggenlijfjes in weefselkweekmedium, zullen plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse II.

Alle handelingen met *C. pipiens* zullen worden uitgevoerd in een ruimte binnen het ML-III lab die fysiek gescheiden is van de rest van het ML-III lab. Deze ruimte wordt de voedingsruimte genoemd. In het ML-III lab, de daaraan grenzende toegangssluis (waar getrapte onderdruk aanwezig zal zijn) en de voedingsruimte zijn UV-muggenvallen en spuitbussen met insecticide aanwezig.

In de voedingsruimte zullen alle handelingen waarbij een mug zou kunnen ontsnappen, zoals het openen van muggenkooien, voedingscontainertjes of voedingsemmertjes, het verdoven van de muggen met CO₂ in de aspirateur of op de CO₂-pad, en handelingen met verdoofde muggen zoals het afnemen van speeksel, plaatsvinden in een muggenkabinet of een met rits afsluitbare muggentent van knuttengaas. Daarbij worden handelingen met muggen buiten een container of emmertje altijd met slechts één mug tegelijk uitgevoerd.

Voorafgaand en na afloop van alle handelingen worden de muggen geteld, zodat kan worden vastgesteld of er muggen ontbreken. Indien een mug wordt vermist, mag de onderzoeker de voedingsruimte niet eerder verlaten voordat deze is getraceerd en vervolgens is gevangen of gedood. In het geval van een calamiteit waarbij meerdere muggen naar de voedingsruimte zijn ontsnapt (bijvoorbeeld bij het openen van een container of emmertje), zal gebruik worden gemaakt van insecticide.

3.2 Werkzaamheden met gg-RVfV viremische schapen in associatie met muggen

Alle werkzaamheden met *C. pipiens* in associatie met schapen die geïnfecteerd zijn voor gg-RVfV, zullen plaatsvinden op DM-III inperkingsniveau. In het dierverblijf en toegangssluis zijn UV-muggenvallen en insecticide aanwezig. De muggen in de voedingscontainer worden voorafgaand en na afloop van alle handelingen geteld zodat kan worden vastgesteld of er muggen ontbreken. Indien een mug wordt vermist, mag de onderzoeker het dierverblijf niet verlaten voordat de mug is getraceerd en gevangen of gedood. In het geval van een calamiteit waarbij meerdere muggen ontbreken en zouden kunnen ontsnappen, zal de ruimte met insecticide worden behandeld. De onderzoeker mag de ruimte niet verlaten voordat alle muggen zijn getraceerd, en zijn gevangen of gedood.

3.3 Werkzaamheden in het algemeen

Bij alle hierboven beschreven werkzaamheden in ML-III lab en DM-III verblijf zal de medewerker volledig sluitende kleding dragen waar muggen niet doorheen kunnen prikken inclusief schoeisel, handschoenen en een volgelaatsmasker met aanblaasfilterunit, zodat er geen enkel contact met de omgeving is. De kleding betreft een kunststof Microgard® 2000 Standard Coverall Model 122. Alle

persoonlijke beschermingsmiddelen en kleding zullen na afloop van de werkzaamheden in de toegangsluis worden achtergelaten.

De muggenkooien, voedingsemmertjes en voedingscontainertjes zorgen ervoor dat de muggen niet kunnen ontsnappen. Zij kunnen echter geen virusdeeltjes tegenhouden indien deze vrij zouden komen. De aanvrager geeft aan dat hoewel er geen aanwijzingen zijn dat (gg-)RVFV door een mug tijdens of na een bloedmaaltijd wordt uitgescheiden, uitscheiding van kleine hoeveelheden virus nooit helemaal kan worden uitgesloten. Daarom is in de voorschriften opgenomen dat de medewerker na elke handeling met gg-RVFV geïnfecteerde muggen de blootgestelde delen van het pak, masker en handschoenen zal ontsmetten.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2008 en in 2014 bij haar actualisatie van pathogeniteitsclassificaties van virussen geadviseerd RVFV in pathogeniteitsklasse 3 in te delen.^{13,14} In het advies van 2008 heeft zij ook geadviseerd over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met volvirulent gg-RVFV. Zij adviseerde deze werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Tevens achtte zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als de handelingen met volvirulent gg-RVFV, conform het voornemen van de aanvrager, uitgevoerd zouden worden in een veiligheidskabinet van klasse 3 (VK-III kabinet).

In 2011 heeft de COGEM geadviseerd over infectiewerkzaamheden met volvirulent gg-RVFV in associatie met schapen.¹⁵ Zij adviseerde de werkzaamheden op DM-III inperkingsniveau uit te voeren. Omdat geïnfecteerde schapen via hun neus en oren RVFV kunnen uitscheiden, en mensen via direct of indirect contact met bloed, weefsels of organen dan wel via inhalatie of inname van aerosolen door deze dieren met RVFV besmet zouden kunnen worden, was zij van mening dat de medewerker maximaal beschermd moest zijn om contact- of aerogene besmetting te voorkomen. Zij adviseerde daarom als aanvullend voorschrift tijdens de werkzaamheden volledig beschermende kleding en een passend, volledig aansluitend volgelaatsmasker te dragen.

In 2013 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht met handvatten voor maatregelen voor het inperken van (gg-)geleedpotigen.¹⁶ Zij presenteert in dit advies een basisset van voorschriften, gebaseerd op de huidige inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster* ('het fruitvliegje'), die kan dienen als uitgangspunt om ontsnapping van (gg-)geleedpotigen te voorkomen. Daarnaast geeft de COGEM in het advies een lijst met overwegingen, die gebruikt kan worden om na te gaan of (en met welke maatregelen) deze basisset eventueel uitgebreid moet worden of kan worden versoerd.

In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over laboratoriumwerkzaamheden met RVFV-4S-ΔNS en werkzaamheden in associatie met schapen en deze deletiemutanten.¹² Het betreft dezelfde mutanten die bij voorliggende adviesvraag gebruikt zullen gaan worden. Omdat de mutant een combinatie van twee verzwakkende modificaties bezit en RVFV zich in de laboratoriumsituatie beperkt kan verspreiden, adviseerde de COGEM de *in vitro* werkzaamheden met RVFV-4S-ΔNS omlaag te schalen naar ML-II inperkingsniveau. Voor *in vivo* werkzaamheden adviseerde zij DM-II

inperkingsniveau te hanteren. Om de kans op infectie van de medewerker verder te minimaliseren adviseerde zij daarbij aanvullend tijdens de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden:

- handschoenen te dragen;
- open handelingen in een VK-II kabinet uit te voeren;
- het gebruik van sharps tot een minimum te beperken en alleen toe te staan in combinatie met kevlar handschoenen;
- bij de werkzaamheden in associatie met schapen een daartoe geëigend beschermend mond/neuskapje met veiligheidsbril of een volgelaatsmasker te dragen.

In 2015 heeft de COGEM ook geadviseerd over werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus* (gg-CHIKV) en gg-*West Nile virus* (gg-WNV) in associatie met muggen.¹⁷ CHIKV en WNV zijn beiden zogenaamde ‘arthropod borne’ virussen (arbovirussen). De werkzaamheden vertoonden overeenkomsten met de werkzaamheden met muggen van het nu voorliggende advies. Naast het feit dat de aanvrager van plan was de werkzaamheden uit te voeren op ML-III inperkingsniveau, gaf hij aan dat het laboratorium en de aangrenzende sluis voorzien zouden zijn van UV-muggenvallen en spuitbussen met insecticiden, de muggen gehouden zouden worden in met knuttengaas afgedekte containers (maximaal 50 muggen per container), alle handelingen met muggen in een met rits afsluitbare muggentent van knuttengaas of in de muggenkamer uitgevoerd zouden worden, en dat betrokken medewerkers witte klompen, sokken, overall, schort en handschoenen zouden dragen. Ten einde aerogene verspreiding van gg-virus en ontsnapping van met gg-virus geïnfecteerde muggen naar het milieu te voorkomen, adviseerde de COGEM aanvullend:

- vóór opening van de muggenkooi en na terugplaatsing van de muggen deze te tellen;
- haar, baard en/of snor (indien aanwezig) met een haarkapje of iets vergelijkbaars te bedekken;
- het altijd aanwezig laten zijn van een spuitbus met insecticide in niet alleen de toegangssluis en ML-III lab, maar ook in de muggentent en muggenkamer;
- open handelingen met gg-CHIKV en gg-WNV in een VK-II kabinet uit te voeren;
- bij de beschreven open handelingen met gg-CHIKV en gg-WNV in de muggentent, een daartoe geëigend beschermend mond/neuskapje (bijvoorbeeld een N95 kapje) en een veiligheidsbril te dragen.

5. Overweging en advies

De aanvrager zal de werkzaamheden al dan niet gecombineerd met muggen op ML-III inperkingsniveau, en de werkzaamheden met geïnfecteerde muggen in associatie met schapen op DM-III inperkingsniveau uitvoeren. Hij zal daarbij aanvullende maatregelen en werkvoorschriften in acht nemen die in lijn zijn met eerdere COGEM adviezen over werkzaamheden met gg-arbovirussen en muggen, al dan niet gecombineerd met schapen.^{12,13,14,15,16,17} De aanvrager geeft daarbij aan dat hij inmiddels 2,5 jaar ervaring heeft met vergelijkbare werkzaamheden, en stelt dat daarbij nog nooit een mug is ontsnapt. Ter illustratie heeft hij bij de vergunningsaanvraag informatiemateriaal meegestuurd. Hiermee worden de voorgenomen werkzaamheden en inperkingsmaatregelen inzichtelijk gemaakt.

De COGEM acht het van belang dat besmetting van de medewerker en uitsleep van gg-RVfV naar het milieu via de medewerker voorkomen wordt. Open handelingen met gg-RVfV worden in een VK-II kabinet uitgevoerd om besmetting van de medewerker te voorkomen.

De aanvrager beschrijft niet in de door hem aangeleverde procedures, hoeveel muggen er zich in de muggenkooien, voedingsemmertjes of voedingscontainers zullen bevinden. De COGEM is van mening dat in verband met het onder controle houden van ontsnappingen van met gg-RVfV geïnfecteerde muggen, een maximaal aantal van 50 muggen wenselijk is. Zij adviseert daarom om, in navolging van haar advies uit 2015 over werkzaamheden met arbovirussen in associatie met muggen,¹⁷ een maximaal aantal van 50 muggen in kooien, containers en emmertjes te hanteren. Daarnaast geeft de COGEM in overweging om, voordat een mug uit de Bugdorm kooi in de aspirateur wordt opgezogen, alle muggen in de kooi met CO₂ te verdoven ten einde onbedoelde ontsnapping van gg-RVfV geïnfecteerde muggen uit de kooi te voorkomen. Deze maatregel is analoog aan de maatregel die gehanteerd wordt bij het selecteren van de gevoede muggen bij het experiment met schapen (zie 2.4).

De werkzaamheden met gg-RVfV geïnfecteerde muggen in het ML-III lab zullen niet in een veiligheidskabinet plaatsvinden. De inperkingsmaatregelen zijn in dat geval primair gericht op het voorkómen van het ontsnappen van muggen (werken in muggentent/ muggenkabinet, immobiliseren muggen, tellen van muggen voorafgaand en na handelingen met muggen, en het standaard aanwezig zijn van spuitbus met insecticide en UV-muggenvallen). Hoewel de COGEM de kans zeer klein acht, kan zij niet helemaal uitsluiten dat tijdens de handelingen met muggen de medewerker via contact- of aerogene transmissie van direct door de mug uitgescheiden gg-RVfV, of via de steek van een bijvoorbeeld niet goed verdoofde geïnfecteerde mug, met gg-RVfV besmet zou kunnen worden. Dit zou indirecte verspreiding van gg-virus naar buiten toe tot gevolg kunnen hebben. De enige barrière ter voorkoming van besmetting of infectie van de medewerker wordt dan mogelijk gemaakt door het dragen van persoonlijke beschermingsmiddelen. De COGEM acht het daarom van belang dat, conform het voorstel van de aanvrager en in lijn met eerdere COGEM adviezen, volledig beschermende sluitende kleding, handschoenen en een volgelaatsmasker gedragen wordt. Om daarnaast de minimale kans op uitsleep van gg-RVfV door middel van contacttransmissie te voorkomen, acht zij het aanvullend van belang dat met betrekking tot de werkzaamheden in het DM-III verblijf, het schoeisel in de toegangssluis achterblijft.

Samengevat kan de COGEM ermee instemmen dat de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III en DM-III worden uitgevoerd. Onder inachtneming van de door de aanvrager voorgenomen aanvullende voorschriften zoals in de aangeleverde procedures zijn vastgelegd, en in navolging van de hierna volgende aanvullende voorschriften conform eerdere COGEM adviezen over vergelijkbare werkzaamheden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein:

- het gebruik van sharps wordt tot een minimum beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlar handschoenen;
- na de werkzaamheden in het DM-III verblijf wordt schoeisel aan de besmette zijde van de sluis achtergelaten;

- tijdens werkzaamheden met gg-RVfV geïnfecteerde muggen wordt in muggenkooien, muggencontainers en voedingsemmertjes een maximaal aantal van 50 muggen gehanteerd.

6. Aanvullende opmerking

De COGEM merkt op dat de voorgenomen inperkingsniveaus en aanvullende (werk)voorschriften ook afdoende zijn wanneer de beschreven experimenten met andere steekmuggen van de familie van de *Culicidae* uitgevoerd zouden worden.

Referenties

1. The World Organisation for Animal Health (OIE). Disease Information Summaries. Rift Valley fever. www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/RVF-EN.pdf (bezocht 20 juni 2016)
2. World Health Organization (WHO; 2010). *Rift Valley fever virus*. Factsheet no. 207. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/ (bezocht 20 juni 2016)
3. Balkhy HH & Memish ZA (2003). Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21: 153-157
4. Busquets N *et al.* (2010). Experimental infection of young adult European breed sheep with *Rift Valley fever virus* field isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10: 689-696
5. Plyusnin A *et al.* (2012). Family Bunyaviridae. 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
6. Billecocq A *et al.* (2004). NSs protein of *Rift Valley fever virus* blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J. Virol.* 78: 9798-9806
7. Ikegami T *et al.* (2006). Rescue of infectious *Rift Valley fever virus* entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J. Virol.* 80: 2933-2940
8. Muller R *et al.* (1995). Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of *Rift Valley fever virus*, which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 405-411
9. Bouloy M *et al.* (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of *Rift Valley fever virus* non-structural protein NSs. *J. Virol.* 75: 1371-1377
10. von Teichman B *et al.* (2011). Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves. *Vaccine* 29: 5771-5777
11. Dungu B *et al.* (2010). Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine* 28: 4581-4587
12. COGEM (2015). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Rift Valley fever virus. COGEM advies CGM/150518/02
13. COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus* (RVfV). COGEM advies CGM/080313-05
14. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/141218-02

15. COGEM (2011). Advies inschaling productie genetisch gemodificeerd *Rift Valley fever virus*. COGEM advies CGM/110322-01 (vertrouwelijk advies)
16. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder ‘ingeperkt gebruik’. COGEM advies CGM/130416-01
17. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met gg-*Chikungunya virus* en gg-*West Nile virus* in combinatie met muggen. COGEM advies CGM/150907-02