

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 mei 2014
KENMERK CGM/140528-01
ONDERWERP Advies inperking van werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van de inperkingsmaatregelen die voor gg-*Drosophila melanogaster* zijn voorgeschreven in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM heeft in haar advies over de Ontwerpregeling, additionele inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster* (fruitvlieg) geadviseerd. In de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 die op 30 april gepubliceerd is, zijn deze maatregelen niet volledig overgenomen. In het onderhavige advies geeft de COGEM een nadere uitwerking van de maatregelen die naast de in de Regeling genoemde maatregelen noodzakelijk zijn om *D. melanogaster* in te perken.

Net als andere vliegende insecten kan *D. melanogaster* zich door de ruimte verspreiden wanneer bij zogenaamde 'open handelingen' een individu zou ontsnappen. De volwassen *D. melanogaster* is vanwege zijn afmetingen lastig terug te vinden. De eieren en larven van *D. melanogaster* zijn klein en daardoor lastig te zien. Daarom zijn specifieke maatregelen noodzakelijk om gg-*D. melanogaster* in te perken.

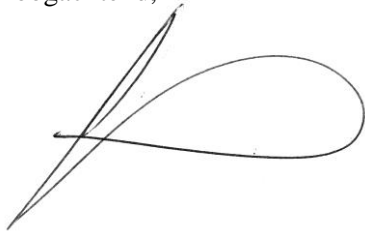
Werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* moeten uitgevoerd worden in een D-I ruimte die voorzien is van een sluis met een binnendeur van (tenminste) gevalideerd insectengaas. Tijdens de werkzaamheden moeten werkkleding en een haarkapje worden gedragen om uitsleep van gg-*D. melanogaster* via de medewerker te voorkomen. Na afloop van de experimenten moeten de gg-vliegen worden afgedood en moeten de werkkleding en de materialen die met gg-*D. melanogaster* in aanraking zijn geweest met een gevalideerde methode worden ontsmet. Aan het einde van de werkzaamheden moeten de werkoppervlakken gedesinfecteerd worden en voor het verlaten van het verblijf moeten de handen worden ontsmet.

De COGEM adviseert de werknemers te scholen, zodat de medewerkers voldoende kennis hebben van *D. melanogaster* en getraind zijn in het werken met gg-*D. melanogaster*.



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
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. ir. C.J.H. Booij van Plant Research International.

Inperking van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster*

COGEM advies CGM/140528-01

Inleiding

De COGEM heeft in een advies over de ‘Ontwerpregeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013’ die op 31 december 2013 in de Staatscourant¹ is gepubliceerd, erop gewezen dat de voorgeschreven maatregelen onvoldoende garantie bieden voor de inperking van genetisch gemodificeerde (gg-) *Drosophila melanogaster*. De COGEM heeft aanvullende maatregelen geadviseerd. Deze maatregelen zijn niet volledig overgenomen in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 die op 30 april gepubliceerd is in de Staatscourant.² Wel is als additionele maatregel opgenomen dat in de werkruimte en in de sluis voor *D. melanogaster* geschikte vallen, zoals een elektrische val, vangplaten, een voedselval of feromoonval, aangebracht moeten zijn. De COGEM heeft besloten de aanvullende maatregelen die volgens haar noodzakelijk zijn voor de inperking van *D. melanogaster* in een advies toe te lichten.

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder ‘ingeperkt gebruik’ mogen de betreffende organismen niet ontsnappen. Daarom worden eisen gesteld aan de inrichting van de betreffende ruimte en de manier waarop de werkzaamheden worden uitgevoerd. Dit zijn de zogeheten inrichtings- en werkvoorschriften, die zijn beschreven in bijlage 9 van de Regeling.

Werkzaamheden met gg-geleedpotigen zoals *D. melanogaster* moeten plaatsvinden in een D-I gesloten dierverblijf. De inrichtings- en werkvoorschriften voor een gesloten dierverblijf zijn echter gericht op het voorkomen van verspreiding van grotere dieren, zoals muizen, apen, koeien en varkens. Ook de voorschriften en de inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-micro-organismen in laboratoria zijn niet geschikt om ontsnapping van gg-geleedpotigen te voorkomen. Gg-geleedpotigen zijn vaak klein en kunnen zich actief verplaatsen en verstoppert. Geleedpotigen reageren daarbij vaak op licht, geuren en/of vochtgehalten. Zij kunnen zich bovendien actief vasthouden aan kleding, huid, haar, planten of bij experimenten gebruikte materialen. Tussen geleedpotigen bestaan grote verschillen in de manier van voortbewegen. Sommige geleedpotigen vliegen, andere kunnen zich met luchtstromen mee laten voeren, terwijl weer andere geleedpotigen lopen. Met al deze eigenschappen moet rekening gehouden worden wanneer werkzaamheden met gg-geleedpotigen beoordeeld worden. De inperkingsmaatregelen die gelden voor een D-I gesloten dierverblijf worden bij werkzaamheden met gg-geleedpotigen daarom altijd aangevuld met aanvullende maatregelen om ontsnapping van de gg-geleedpotigen te voorkomen.

Eerdere COGEM adviezen

In 2001 heeft de COGEM geadviseerd werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* uit te voeren in een D-I dierverblijf of in een PC-II kweekcel met aanvullende voorschriften.³ In 2005 heeft de COGEM geadviseerd over de methode voor het afdoden van *D. melanogaster*.⁴ In 2013 heeft de COGEM

onderzoek laten uitvoeren naar maatregelen om ontsnapping van gg-geleedpotigen te voorkomen.⁵ Dit onderzoek heeft geleid tot een COGEM advies waarin een basisset van inperkingsmaatregelen wordt geadviseerd voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen. Deze basisset kan afhankelijk van de soort waarmee onder ‘ingeperkt gebruik’ gewerkt wordt, versoberd of uitgebreid worden.⁶

Kenmerken van *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (ook bekend als de fruitvlieg of bananenvlieg) behoort tot de orde van de tweevleugeligen (Diptera) en de familie *Drosophilidae*. *D. melanogaster* is relatief gemakkelijk genetisch te modificeren en wordt wereldwijd als modelorganisme gebruikt voor onderzoek. Ook in Nederland wordt door een aantal onderzoeksgroepen gewerkt met *D. melanogaster*.

D. melanogaster plant zich geslachtelijk voort. *D. melanogaster* wordt aangetrokken door vrijwel alle soorten overrijp en rottend fruit en hierop worden eieren gelegd (ca. 400) die langwerpig van vorm zijn (ongeveer 0,5 mm lang en 0,2 mm breed). Na ongeveer 24 uur komen er larven uit de eieren die zich voeden met de gistcellen die zich op het rottende fruit bevinden. De ontwikkeling verloopt via 3 larvale stadia die gezamenlijk ongeveer 6 dagen duren. Tijdens het verpoppen ondergaat de larve een complete metamorfose tot volwassen fruitvlieg. De adulte fruitvliegen zijn na ongeveer 8 uur vruchtbaar. Bij een omgevingstemperatuur van 21-23°C duurt de volledige ontwikkeling van ei tot volwassen fruitvlieg 10-12 dagen. Er zijn duidelijke verschillen tussen de geslachten bij *D. melanogaster*. Het achterlichaam van het mannetje is rond en donker van kleur, terwijl die van het vrouwtje spits van vorm en gestreept is. Het mannetje is iets kleiner dan het vrouwtje dat ongeveer 2,5 mm lang is.⁷

D. melanogaster komt wereldwijd voor en is gevoelig voor temperatuur. Bij lagere temperaturen gaat de ontwikkeling van *D. melanogaster* trager. Eieren, larven en poppen van *D. melanogaster* kunnen zich aanpassen aan lage temperaturen wanneer zij eerst gekoeld worden.^{8,9} Voor 15 uur oude *D. melanogaster* eieren is aangetoond dat 50% mortaliteit optreedt na één uur opslag bij -15°C. Larven en poppen overleven 2 uur bevriezing bij -5°C, respectievelijk -8°C, niet.^{8,10}

Overwegingen

Bij de inperking van gg-*D. melanogaster* moet er net als bij andere vliegende insecten rekening mee gehouden worden dat ze na een eventuele ontsnapping uit de insectenkooien waarin zij worden gehouden, moeilijk terug te vinden zijn. Daarnaast zijn de eieren en larven erg klein en lastig te zien waardoor ze ongezien meegenomen kunnen worden uit de werkruimte. In bijlage 9 van de Regeling staan in paragraaf 9.1.4.1.2.3.2 ‘Voor aanvullende voorschriften voor activiteiten met genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster*’ beschreven welke maatregelen noodzakelijk zijn bij de werkzaamheden met gg-*D. melanogaster*. De COGEM is van mening dat een aantal maatregelen toegevoegd moeten worden om tot een effectieve inperking van gg-*D. melanogaster* te komen.

Additionele inperkingsmaatregelen

In het verleden heeft de COGEM geadviseerd dat de maaswijdte van insectengaas gevalideerd moet zijn voor het betreffende insect aangezien er verschillende maaswijdten van insectengaas verkrijgbaar zijn.⁶ Daarom heeft de COGEM geadviseerd dat voor de inperking van *gg-D. melanogaster* insectengaas gebruikt moet worden dat gevalideerd is voor *gg-D. melanogaster*.

In de Regeling wordt gesteld dat een gesloten D-I verblijf waarin met *D. melanogaster* gewerkt wordt, een sluis bevat waarvan de opening aan de buitenkant is voorzien van een deur en de opening aan de binnenkant is afgesloten met een gordijn van insectengaas. De COGEM wijst erop dat door het ontstaan van kieren rond het gordijn en luchtbewegingen die veroorzaakt worden door beweging van het gordijn, er een risico is op het ontsnappen van *D. melanogaster*. De COGEM adviseert een deur of een gaasdeur die voorzien is van gevalideerd insectengaas aan de binnenkant van de sluis voor te schrijven.

Voordat werkzaamheden met *D. melanogaster* uitgevoerd worden, moeten de vliegen verdoofd worden. Wanneer een volwassen fruitvlieg onverhoopt voortijdig bijkomt en zich in de ruimte verspreidt, is het zeer lastig terug te vinden vanwege de geringe afmetingen. De vliegen kunnen mogelijk in het haar van de medewerker terechtkomen waardoor ze via de sluis mee naar buiten zouden kunnen liften. Daarom adviseert de COGEM dat tijdens de werkzaamheden met *gg-D. melanogaster* een haarkapje gedragen moet worden, dat na afloop van de werkzaamheden bij de overige werkkleding in de sluis achter moet blijven.

In de Regeling wordt gesteld dat besmet materiaal ontsmet moet worden door het minimaal 10 uur te bevriezen bij -20°C. Dit voorschrift biedt echter geen ruimte voor andere methoden van ontsmetting of afdoding. In 2005 heeft de COGEM een advies uitgebracht waarin bevriezing als gevalideerde methode voor het afdoden van *D. melanogaster* beschreven is, waardoor het niet nodig is om materialen en kleding hierna alsnog te steriliseren.⁴ De COGEM is van mening dat wanneer er een autoclaaf in de ruimte aanwezig is, deze ook gebruikt mag worden om *gg-D. melanogaster* af te doden in plaats van bevriezing. Aangezien beide methoden geschikt zijn, adviseert de COGEM als doelvoorschrift op te nemen dat *gg-D. melanogaster* op een gevalideerde manier afgedood moet worden en dat mogelijk met *gg-D. melanogaster* besmet materiaal op een gevalideerde manier ontsmet moet worden.

Vanwege de kleine afmetingen zijn de eieren en larven van *D. melanogaster* moeilijk waar te nemen en kunnen ze gemakkelijk achterblijven of verspreid worden. Daarom moeten de oppervlakten van de werkbanken na afloop van de werkzaamheden en aan het einde van de dag gedesinfecteerd worden en moeten de handen bij het verlaten van het verblijf ontsmet worden.

Ervaringen uit de praktijk leren dat het voorschrijven van inperkingsmaatregelen alleen onvoldoende garantie biedt dat ontsnapping van geleedpotigen zoals *D. melanogaster* wordt voorkomen. Er zijn talloze gevallen bekend waarbij wild-type geleedpotigen door ontsnapping uit laboratoria buiten

aanwezig zijn. Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om medewerkers te trainen voordat met gg-*D. melanogaster* gewerkt mag worden. Hierbij wordt gedacht aan vaardigheidstrainingen o.a. in het verdoven van *D. melanogaster* en kennis over het gedrag van *D. melanogaster*.

Aandachtspunten

Wanneer de insectenkooien of containers voor experimenten geopend moeten worden is het aan te bevelen om na afloop van de experimenten het aantal gg-*D. melanogaster* te tellen om te zien of er tijdens de experimenten vliegen zijn ontsnapt. De COGEM is zich ervan bewust dat het tellen van gg-*D. melanogaster* bij grote aantallen, zoals bij kweek, niet uitvoerbaar is. Daarom zouden handelingen met grote aantallen gg-*D. melanogaster* in een afgesloten ruimte, zoals een veiligheidskabinet, kunnen plaatsvinden.

Advies

Samenvattend adviseert de COGEM om in aanvulling op de maatregelen die al zijn voorgeschreven de onderstaande maatregelen op te nemen in paragraaf 9.1.4.1.2.3.2 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013'. De COGEM adviseert doelvoorschriften op te nemen wanneer verschillende methoden of maatregelen even doeltreffend zijn zodat de aanvragers voor de methoden of maatregelen kunnen kiezen die in hun situatie het best passend is en voorschriften niet aangepast hoeven te worden wanneer nieuwe methoden beschikbaar zouden komen.

Additionele inrichtingsvoorschriften:

1. Het verblijf heeft een sluis met twee deuren, die niet tegelijkertijd geopend mogen worden. De deuren zijn aan de onderzijde voorzien van veegborstels en aan de zij- en bovenkant zijn tochtstrips in de sponning aangebracht. De binnendeur mag een gaasdeur zijn met voor *D. melanogaster* gevalideerd gaas;
2. Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van gaas dat gevalideerd is voor *D. melanogaster*;
3. Een wastafel en een dispenser voorzien van zeep of een andere voorziening voor het gevalideerd ontsmetten van de handen is aanwezig in de werkruimte;
4. Een autoclaaf is in de ruimte aanwezig indien een autoclaaf onderdeel uitmaakt van de gevalideerde methode voor het afdoden van afval of gg-*D. melanogaster*.

Additionele werkvoorschriften:

1. Een haarkapje is onderdeel van de werkkleding en wordt tijdens de werkzaamheden gedragen;
2. Alvorens werkkleding het verblijf verlaat wordt deze op een zodanige manier behandeld, dat eventuele aanwezige *D. melanogaster* wordt gedood;
3. Besmet materiaal dient te worden ontsmet en afval moet worden afgedood door een voor *D. melanogaster* gevalideerde methode. Hetzelfde gebeurt aan het eind van het experiment met *D. melanogaster*;
4. Werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;

5. Bij het verlaten van het verblijf worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met desinfectans;
6. Medewerkers zijn getraind in het werken met gg-*D. melanogaster* en hebben kennis over *D. melanogaster* m.n. over de eigenschappen die voor de inperking van belang zijn (zoals gedrag).

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Ontwerpregeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, Staatscourant 2013 nr. 24198
2. Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu, van 14 april 2014, nr. IenM/BSK-2014/88344, houdende regels met betrekking tot het ingeperkt gebruik en de doelbewuste introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013), Staatscourant 2014 nr. 11317
3. COGEM (2001). Transgene landbouwinsecten. COGEM advies CGM/010424-01
4. COGEM (2005). Afdoding van genetisch gemodificeerde insecten. COGEM advies CGM/050215-04
5. Booij K. (2013). Options for Containment of Genetically Modified Mobile Arthropods. COGEM onderzoeksrapport CGM 2013-02
6. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder 'ingeperkt gebruik'. COGEM advies CGM/130416-01
7. An introduction to *Drosophila melanogaster*, University of Arizona.
<http://pedrovalle.files.wordpress.com/2013/10/fly-manual.pdf>
8. Czajka MC & Lee RE. (1990). A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. J Exp Biol 148: 245-54
9. Kelty JD & Lee RE. (2001). Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. J Exp Biol. 204:1659-66
10. Mazur P *et al.* (1992). Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. Cryobiology 29(1): 39-68