

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
drs. Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 31 oktober 2024
KENMERK CGM/241031-01
ONDERWERP Advies inperkingsmaatregelen werkzaamheden gg-*Drosophila melanogaster*

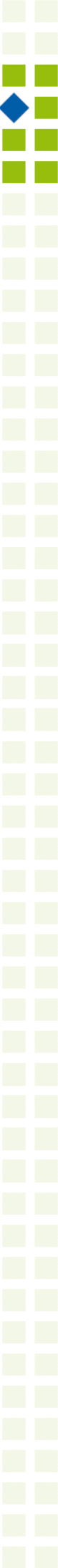
Geachte heer Jansen,

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

Samenvatting:

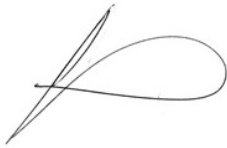
In de Regeling ggo worden een aantal inperkingsmaatregelen voorgeschreven voor werkzaamheden met genetische gemodificeerde (gg-) *Drosophila melanogaster*. De COGEM adviseert een aantal aanvullende maatregelen in de Regeling ggo op te nemen om het risico op ontsnapping van gg-*D. melanogaster* uit laboratoria en dierverblijven verder te minimaliseren. Deze aanvullende maatregelen zijn onder meer noodzakelijk omdat zowel de eieren, larven als volwassen exemplaren van *D. melanogaster* vanwege hun afmetingen lastig terug te vinden zijn.

De COGEM adviseert om werkzaamheden met gg-*D. melanogaster* te laten plaatsvinden in een D-I ruimte die voorzien is van een sluis met twee deuren in plaats van de in de Regeling vermelde deur en gordijn. Afdoding van de insecten en ontsmetting van werkkleding en materialen die met gg-*D. melanogaster* in aanraking zijn geweest kan plaatsvinden d.m.v. bevroering of autoclaving. Aan het einde van de werkzaamheden moeten de werkoppervlakken gedesinfecteerd worden en voor het verlaten van het verblijf moeten de handen worden ontsmet. Daarnaast adviseert de COGEM de vergunninghouder om de werknemers te trainen 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. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Inperking van werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster*

COGEM advies CGM/241031-01

1. Inleiding

De COGEM heeft er eerder op gewezen dat de in de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo) voorgeschreven maatregelen voor handelingen met genetisch gemodificeerde (gg-) *Drosophila melanogaster* onvoldoende garantie bieden voor de inperking van deze fruitvliegen en aanvullende maatregelen geadviseerd.^{1,2} Een deel van deze maatregelen is nog niet overgenomen in de Regeling ggo.^{3,4} Middels dit advies wil de COGEM nogmaals de noodzaak voor het opnemen vanaanvullende inperkingsmaatregelen onder de aandacht brengen.

2. Huidige inperkingsmaatregelen voor gg-geleedpotigen

Bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onder 'ingeperkt gebruik' mogen de betreffende organismen zich niet verspreiden buiten de betreffende inrichting. 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 ggo.⁴

Werkzaamheden met gg-geleedpotigen zoals *D. melanogaster* moeten plaatsvinden in een D-I gesloten dierverblijf. De standaard inrichtings- en werkvoorschriften voor een gesloten dierverblijf zijn hoofdzakelijk 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. 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.^{1,5}

3. Kenmerken van *Drosophila melanogaster*

D. 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 modifieren en wordt wereldwijd als modelorganisme gebruikt voor onderzoek. Ook in Nederland wordt gewerkt met *D. melanogaster* door een aantal onderzoeksgroepen.

D. melanogaster plant zich geslachtelijk voort. De fruitvlieg 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 gistcellen die zich op het rottende fruit bevinden. De ontwikkeling verloopt via drie 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 2 tot 4 mm lang is.⁶

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.^{7,8} Voor 15 uur oude *D. melanogaster* eieren is aangetoond dat 50% mortaliteit optreedt na één uur opslag bij -15°C. Bevriezing voor 2 uur bij -5°C voor larven en -8°C voor poppen is dodelijk.⁷Error! Bookmark not defined..9

4. Eerder COGEM advies

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.¹⁰ In 2005 heeft de COGEM geadviseerd over de methode voor het afdoden van *D. melanogaster*.¹¹ In 2013 heeft de COGEM onderzoek laten uitvoeren naar maatregelen om ontsnapping van gg-geleedpotigen te voorkomen.¹² Dit onderzoek heeft geleid tot een 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, versoerd of uitgebreid worden.¹

In 2013 heeft de COGEM op verzoek geadviseerd over de “Ontwerpregeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013”, waar het missen van enkele maatregelen voor *D. melanogaster* is aangekaart.¹³ In 2014 is dit advies verder uitgewerkt.² In 2022 heeft de COGEM advies gegeven over inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-*Drosophila suzukii* (de Suzuki-fruitvlieg).¹⁴

5. Overweging

Bij de inperking van gg-*D. melanogaster* moet rekening gehouden worden met het feit 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 activiteiten met genetisch gemodificeerde *Drosophila melanogaster*’ beschreven welke maatregelen noodzakelijk zijn bij de werkzaamheden met gg-*D. melanogaster*.⁴ De COGEM is van oordeel dat een aantal maatregelen toegevoegd moeten worden om tot een effectieve inperking van gg-*D. melanogaster* te komen.

5.1 Additionele inperkingsmaatregelen

In het verleden heeft de COGEM erop gewezen dat de maaswijdte van insectengaas geschikt moet zijn voor de inperking van het betreffende insect aangezien er verschillende maaswijdten van insectengaas verkrijgbaar zijn.¹ Daarom heeft de COGEM geadviseerd dat voor de inperking van *gg-D. melanogaster* insectengaas gebruikt moet worden dat geschikt 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 om aan de binnenzijde van de sluis een deur, of een gaasdeur die voorzien is van geschikt insectengaas, voor te schrijven.

In de Regeling ggo wordt gesteld dat besmet materiaal en afval ontsmet moet worden door het minimaal 10 uur te bevriezen bij -20°C.⁴ Dit voorschrift biedt echter geen ruimte voor andere methoden van ontsmetting of afdoding. De COGEM is van mening dat wanneer er een autoclaaf in de ruimte aanwezig is, deze ook gebruikt kan worden om *gg-D. melanogaster* af te doden in plaats van bevriezing. Aangezien beide methoden geschikt zijn, adviseert de COGEM om ze alle twee in de Regeling ggo op te nemen voor afdoding van *gg-D. melanogaster*, afval en mogelijk besmet materiaal.

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.

Naast het voorschrijven van inperkingsmaatregelen om ontsnapping van geleedpotigen zoals *D. melanogaster* te voorkomen, adviseert de COGEM de vergunninghouder 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*.

6. Advies

Samenvattend adviseert de COGEM om in aanvulling op de maatregelen die 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'.

Vervangende/additionele voorschriften:

- 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 tochtstrippen in de sponning aangebracht. De binnendeur mag een gaasdeur zijn met voor *D. melanogaster* geschikt gaas; (vervangt 9.1.4.1.2.3.2.a.)

- Een diepvriezer (-20°C) is in het verblijf aanwezig indien de diepvriezer onderdeel uitmaakt van de methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. melanogaster*; (vervangt 9.1.4.1.2.3.2.g.)
- Een autoclaaf is in de ruimte aanwezig indien de autoclaaf onderdeel uitmaakt van de methode voor het ontsmetten van besmet materiaal, het afdoden van afval of het afdoden van *D. melanogaster*;
- Besmet materiaal en afval wordt ontsmet door minimaal 10 uur te bevriezen bij –20°C of door te autoclavieren. Hetzelfde gebeurt aan het eind van het experiment met de insecten; (9.1.4.1.2.3.2.k.)
- Een wastafel en een dispenser voorzien van zeep of een andere voorziening voor het ontsmetten van de handen is aanwezig in de werkruimte;
- Werkoppervlakken worden gedesinfecteerd aan het eind van de werkzaamheden en aan het einde van iedere werkdag;
- Bij het verlaten van het verblijf worden de handen gewassen met zeep of ontsmet met desinfectans;
- Medewerkers zijn getraind in het werken met gg-*D. melanogaster* en hebben kennis over *D. melanogaster* met name over de eigenschappen die voor de inperking van belang zijn (zoals gedrag).

Referenties

1. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder 'ingeperkt gebruik'. COGEM advies CGM/130416-01
2. COGEM (2014). Advies inperking van werkzaamheden met gg-*Drosophila melanogaster*. COGEM advies CGM/140528-01
3. Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu, van 14 april 2014, nr. IenM/BSK2014/88344, 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
4. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 9
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2024-04-01> (bezocht op: 24-05-2024)
5. Booij K. (2013). Options for Containment of Genetically Modified Mobile Arthropods. COGEM onderzoeksrapport CGM 2013-02
6. Perveen FK. (2018). 'Introduction to Drosophila'. *Drosophila Melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. InTech.
7. Czajka MC & Lee RE. (1990). A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 148: 245-54
8. Kelty JD & Lee RE. (2001). Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J Exp Biol*. 204:1659-6
9. Mazur P et al. (1992). Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* 29(1): 39-68
10. COGEM (2001). Transgene landbouwinsecten. COGEM advies CGM/010424-01

11. COGEM (2005). Afdoding van genetisch gemodificeerde insecten. COGEM advies CGM/050215-04
12. Booij K. (2013). Options for Containment of Genetically Modified Mobile Arthropods. COGEM onderzoeksrapport CGM 2013-02
13. COGEM (2013) Advies Ontwerpregeling ggo onder de loep CGM/140131-01
14. COGEM (2022). Inschaling van werkzaamheden met gg-*Drosophila suzukii* fruitvliegen waarin een zogenaamde split gene drive is aangebracht. COGEM advies CGM/220425-01