



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Risicobeoordeling van ggo's onder Ingeperkt Gebruik

Marja Agterberg
Bureau GGO



Besluit ggo 2013:

Artikel 2.5:

voor werkzaamheden met ggo's geldt dat er altijd vooraf een analyse van de risico's voor mens of milieu moet worden gemaakt.

Regeling ggo 2013:

Bijlage 5: Uitvoeren risicobeoordeling
 Uitkomst van de risicobeoordeling bepaalt:

- inperkingsniveau
- CFI
- procedure: KG/VA



Stappen in de risicobeoordeling

- Stap 1: Evaluatie van mogelijke schadelijke effecten van het ggo en gevolgen hiervan
- Stap 2: Waarschijnlijkheid optreden schadelijke effecten
- Stap 3: Risicobepaling (1 X 2)
- Stap 4: Risicomanagement
- Stap 5: Bepaling uiteindelijke risico

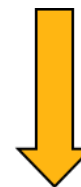


Definitie van risico

- $\text{Risico} = \text{Mogelijk schadelijk effect} \times \text{Waarschijnlijkheid}$



Gastheer
Vector
Donorsequentie
ggo
Activiteiten
Effect op mens en milieu



factor 0 - 1

waarschijnlijkheid is onzeker
dus nooit 0
dus factor = 1
worst case scenario



Stappen in de risicobeoordeling

Risico = Mogelijk schadelijk effect x Waarschijnlijkheid

- Stap 1: Evaluatie van mogelijke schadelijke effecten en gevolgen hiervan
- Stap 2: Waarschijnlijkheid optreden schadelijke effecten
- Stap 3: Risicobepaling (1 X 2)
- Stap 4: Risicomanagement:
niveau I, II, III, IV
CFI
plus benodigde aanvullende voorschriften
- Stap 5: Bepaling uiteindelijke risico



- Maatregelen toepassen om het risico terug te brengen tot een acceptabel niveau:
de fysische inperking
- Bijlage 9: Standaard werk- en inrichtingsvoorschriften
 - ML-I verspreiding **beperken** **VMT-lab**
 - ML-II verspreiding **tegengaan** **beperkte toegang, VK-2**
 - ML-III verspreiding **voorkomen** **sluis, onderdruk, HEPA filter, VK-2**
 - ML-IV verspreiding **uitsluiten** **VK-3, volledig beschermende kleding**

Additionele voorschriften voor niveau I en II:
specifieke organismen
speciale activiteiten
inschalen via deel II van bijlage 5



Stappen in de risicobeoordeling

Risico = Mogelijk schadelijk effect x Waarschijnlijkheid

- Stap 1: Evaluatie van mogelijke schadelijke effecten en gevolgen hiervan
- Stap 2: Waarschijnlijkheid optreden schadelijke effecten
- Stap 3: Risicobepaling (1 X 2)
- Stap 4: Risicomanagement
- Stap 5: Bepaling uiteindelijke risico
Moet voor ggo's altijd verwaarloosbaar klein zijn



Risicobeoordeling

Bijlage 8

- Uitgebreide beschrijving alle stappen in de risicobeoordeling voor IG

Bijlage 5

- Generieke, gestandaardiseerde benadering voor de risicobeoordeling waarin stappen 1 t/m 4 zijn vastgelegd
- “Spoorboekje”
- Inschalen
 - Bijlage 5, deel I: inperkingsniveau (I, II, III, IV)
CFI (ML-II, D-I, PCM-III, MI-II)
 - Bijlage 5, deel II: additionele aanvullende voorschriften I en II



Inschalen = risicobeoordeling

Inschaling vindt plaats op basis van:

De samenstelling van het ggo:

- Eigenschappen gastheer
- Eigenschappen vector
- Eigenschappen ingebrachte donorsequenties

In combinatie met de handelingen met het ggo:

- Kleinschalige of grootschalige handelingen
- Handelingen met dieren of planten in combinatie met ggo's
- Bepaalde risicovolle handelingen (aerosolvorming, injecteren, windproeven)



Pathogeniteitsklassen micro-organismen

- Klasse 1: apathogeen niveau I, ML-I
 (*E. coli* K12)
- Klasse 2: geen ernstige ziekte, niveau II, ML-II
 verspreiding **onwaarschijnlijk**,
 profylaxe, behandeling beschikbaar
 (*E. coli* wildtype, Adenovirus)
- Klasse 3: ernstige ziekte niveau III, ML-III
 verspreiding **waarschijnlijk**
 profylaxe, behandeling beschikbaar
 (*Mycobacterium tuberculosis*, HIV)
- Klasse 4: ernstige ziekte niveau IV, ML-IV
 verspreiding **waarschijnlijk**
 profylaxe, behandeling niet beschikbaar
 (Lassa virus)

Inperkingsniveau wordt primair bepaald door classificatie van het micro-organisme



Eigenschappen gastheren

- Bijlage 2, Lijst A1:
apathogene bacteriën en schimmels
- Bijlage 4.1:
pathogene virussen (dier, humaan of plant)
- Bijlage 4.2 t/m 4.4:
pathogene bacteriën, schimmels
en parasieten
- Bijlage 7: planten

Enterococcus mundtii
Enterococcus sulfureus
Erwinia carnegieana
Erythrobacter litoralis
Erythrobacter longus
Erythromicrobium ramosum
Escherichia blattae
Escherichia coli B
Escherichia coli C
Escherichia coli K12
Escherichia coli W
Eubacterium acidaminophilum
Eubacterium angustum

<i>Mycobacterium marinum</i>	2
<i>Mycobacterium microti</i>	3
<i>Mycobacterium porcinum</i>	2
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2
<i>Mycobacterium senegalense</i>	2
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	2
<i>Mycobacterium simiae</i>	2
<i>Mycobacterium szulgai</i>	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	3
<i>Mycobacterium vaccae</i>	2
<i>Mycobacterium xenopi</i>	2



Eigenschappen vectoren

- Grootte en samenstellende delen dienen bekend te zijn
- Aard van de vector:
 - virale vector
 - zelfoverdraagbare vector
- Schadelijke onderdelen: transposons, antibioticumresistentie genen *beschouwen onder donorsequenties*
- Reguliere abr genen (AmpR, HygR, NeoR, ZeoR, CmR, EmR) worden voor kleinschalige handelingen niet als schadelijk beschouwd
- Virale sequenties (beoordelen in combinatie met gastheer), zoals SV40 ori, EBV ori



Eigenschappen donorsequentie: karakterisatie

Ongekaracteriseerde sequentie: inschalen bijlage 5 a t/m e

Bepaal herkomst sequentie = **donororganisme**

Donor bevat **geen schadelijk genproduct**: inschalen volgens e
micro-organismen van lijst A1, land- of tuinbouwgewas

geen verhoogde inschaling

klonering sequenties uit appel in *E.coli* K12, 5.2.e=ML-I

Donor bevat **schadelijk genproduct**: inschalen volgens a
Mycobacterium tuberculosis, klasse 3

verhoogde inschaling

klonering sequenties uit *M. tuberculosis* in *E.coli* K12, 5.2.a=ML-II



Eigenschappen donorsequentie: karakterisatie

Gekarakteriseerde sequentie: inschalen volgens f t/m i

Functie van sequentie is bekend

Sequentie is **niet schadelijk**: inschalen volgens i
huishoudgen

geen verhoogde inschaling

klonering huishoudgen uit appel in *E.coli* K12, 5.2.i=ML-I

Sequentie is **schadelijk**: inschalen volgens f
toxine uit bij/slang

EN werkzaam in gastheer

verhoogde inschaling

klonering toxine in *E. coli* K12, 5.2.f=ML-II



Eigenschappen donorsequenties: schadelijkheid

Voorbeelden van schadelijke genproducten:

- Toxines
- Allergenen
- Prionen, aggregerende eiwitten betrokken bij Alzheimer
- Bepaalde antibioticumresistentie genen (VancR, ESBLs)
- Transposons
- Oncogenen
- Immuunmodulerende sequenties

- Context (bv eigenschappen gastheer) wordt meegewogen bij bepaling schadelijkheid

- Toepassing schadelijke genproducten kan zorgen voor een hogere inschaling: ML-II (via 5.2.f) i.p.v. ML-I (via 5.2.i)



Risicobeoordeling uitvoeren

Gastheer organisme	pathogeniteitsklasse mo verspreidingswijze plant	bijlage 2 of 4 bijlage 7
Gastheer cellijn	eigenschappen vaststellen	internet, OL, VM
Vector plasmide	eigenschappen vaststellen	A2, internet, OL, VM
Vector virus	pathogeniteitsklasse virus	bijlage 4
Donorsequentie	gekaracteriseerd / ongekarakteriseerd schadelijk / onschadelijk	
Ggo	context: werkzaam in gastheer omlaagschaling	onderbouwen onderbouwen
Activiteiten	standaard activiteiten speciale activiteiten ontheffing	bijlage 9 RB onderbouwen RB onderbouwen



- Extra uitleg over de verschillende inschalingsartikelen van bijlage 5
- Voorbeelden van inschalingen



Standaard inschalingsartikelen bijlage 5

Deel I Standaard inschalingsartikelen voor activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen, onder andere:

- 5.2 Activiteiten met gg micro-organisme vermeld op lijst A1
- 5.3 Activiteiten met gg micro-organisme van klasse 4, 3, 2 of 1
- 5.4 Activiteiten met gg animale cellen dan wel plantencellen.
- 5.5 Handelingen met planten.
- 5.6 Handelingen met dieren.
- 5.7 Handelingen in procesinstallaties.

Deel II Bepaling van eventuele aanvullende voorschriften voor activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen op inperkingsniveau I en II.



Bijlage 5, artikel 5.2: apathogene micro-organismen

- Activiteiten (vervaardiging / handelingen) GGO bestaand uit:
 - Gastheer van lijst A1 (apathogene micro-organismen)
 - Vector van lijst A2 (reeds beoordeeld in combinatie met lijst A1)
 - Wordt met name beoordeeld aan de hand van de insertie:

Voorbeelden klonering in *E. coli* K12:

- specifiek PCR fragment uit *Salmonella typhi* (PG3) coderend voor enzym: ML-I (5.2.i, gekarakteriseerd, geen schadelijk genproduct)
- cDNA bank uit *S. typhi* (PG3), ongekaracteriseerde sequentie: ML-II (5.2.a, donororganisme bevat toxine)
- Vancomycine resistentie gen: ML-II (5.2.f, schadelijk genproduct)



Bijlage 5, artikel 5.3: pathogene micro-organismen

- Opbouw artikel 5.3 identiek aan 5.2 voor wat betreft insertie
- Beoordeling met name aan de hand van gastheer classificatie (bijlage 4)

Voorbeelden klonering in *Mycobacterium*:

- Klonering GFP in *M. tuberculosis* (PG3): ML-III (5.3.i, gekarakteriseerd, geen schadelijk genproduct)
- Klonering GFP in *M. avium* (PG2): ML-II (5.3.i, gekarakteriseerd, geen schadelijk genproduct)
- Klonering virulentiefactor *M. tuberculosis* in *M. avium*: ML-III (5.3.f, gekarakteriseerd, schadelijk genproduct)
- Micro-organisme niet vermeld op 'Lijst pathogenen': gegevens aanleveren en classificatie onderbouwen (2.13 verzoek).



Bijlage 5, artikel 5.4: animale cellen/plantencellen

Inschaling wordt bepaald door:

1. **Wijze van modificatie** van de cellen:

5.4.1 vector is een plasmide,

5.4.2 vector is viraal, biologisch ingeperkt,

5.4.3 vector is viraal, biologisch niet ingeperkt.

2. Aard van de insertie:

Ongekaracteriseerd (a t/m e),

Gekarakteriseerd (f t/m i).



Bijlage 5.4.1 Cellen in associatie met plasmide

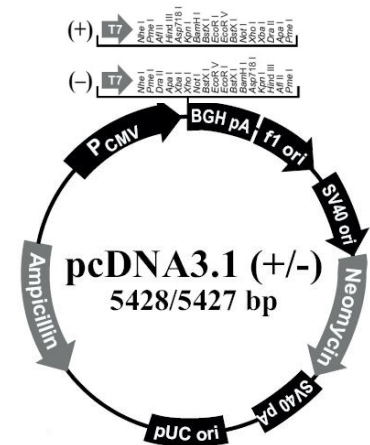
Inschaling volgens artikel 5.4.1 is bedoeld voor (niet-virale) transfectie van animale of plantencellen.

Naast de insertie (schadelijke genproducten) dienen op het plasmide aanwezige virale sequenties in combinatie met de gastheercel beschouwd te worden.

Voorbeelden:

Transfectie pcDNA3.1 in THP-1 cellen: ML-I (5.4.1.i, pcDNA3.1 bevat geen schadelijk genproduct)

Transfectie pcDNA3.1 in COS-7 cellen: ML-II (5.4.1.g, pcDNA3.1 bevat SV40 ori, COS-7 bevat wildtype SV40 sequenties, mogelijkheid vorming recombinant SV40 virus)





Bijlage 5.4.2 Biologisch ingeperkte virale systemen

Inschaling volgens artikel 5.4.2 is slechts toegestaan voor een beperkte groep van biologisch ingeperkte virale systemen.

Virale vectoren afgeleid van **virusgroep A**, bv:

- baculovirus met p10-deletie of met polyhedrine-deletie;
- modified vacciniavirus Ankara (MVA)
- AAV vectoren

Inschaling is (meestal) ML-I

Virale vectoren afgeleid van **virusgroep B** (afgeleid van **klasse 3** virussen):

- lentivirus dat wordt vervaardigd met een tweede of derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem of een translentiviraal systeem.

Inschaling is (meestal) lager dan classificatie van het oudervirus (PG3)

Voorbeeld:

GFP in derde generatie SIN lentivirus (PG3): ML-II (5.4.2.i)



Bijlage 5.4.3 overige virale systemen

Niet onder artikel 5.4.2 genoemde systemen

Virussen afgeleid van **klasse 2** virussen, bv:

-retrovirus, adenovirus, sindbis virus vectoren.

Virussen afgeleid van **klasse 3** virussen, bv:

-lentivirus (3^e generatie SIN) gepseudotypeerd met GALV-envelop.

Inschaling via bijlage 5 is **niet** lager dan classificatie van het oudervirus

Voorbeeld:

- GFP in adenovirus vector (PG2): ML-II (5.4.3.i, gekarakteriseerd, geen schadelijk genproduct)



Bijlage 5, artikel 5.5: gg planten

- Onderscheid in:
 - bloeiende / niet-bloeiende planten,
 - zelfbestuiver / insectenbestuiver / windbestuiver
 - overige **plantkarakteristieken**
- Risico betreft verspreiding van reproductieve plantendelen: pollen, zaden, vegetatieve delen.
- Inschaling PL-I/PC-I/PK-I (5.5.1) plus aanvullende voorschriften per plantensoort vastgesteld in **bijlage 7**





Bijlage 5, artikel 5.5: gg planten



Genetisch gemodificeerde plantensoort	Aanvullende voorschriften in PKa-I, PCM-I, PCM-II-k, PKM-I of PKM-II-k voor:	Aanvullende voorschriften in PC-I of PKb-I, voor:	Bijzonder kenmerk van de plant of ten aanzien van (zaad) verspreiding
<i>Agrostis stolonifera</i>	insectenbestuivers, windbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	windbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	klein zaad
<i>Agrostis tenuis</i>	insectenbestuivers, windbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	windbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	klein zaad
<i>Allium cepa</i>	insectenbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	gemakkelijke zaadverspreiders	windstrooiers: zaden worden door plant 'weggeslingerd'
<i>Allium porrum</i>	insectenbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	gemakkelijke zaadverspreiders	windstrooiers: zaden worden door plant 'weggeslingerd'

9.1.2.1.3.2. Voor activiteiten met gemodificeerde planten aangeduid als windbestuivers

- De bloeiwijzen worden pollendicht ingehuld, of
- De kweekcel bevat voorzieningen, waarmee pollenverspreiding wordt voorkomen.

9.1.2.1.3.3. Voor activiteiten met gemodificeerde planten aangeduid als gemakkelijke zaadverspreiders

- Iedereen, die de kas betreedt, draagt passende beschermende kleding. Deze kleding wordt na afloop van de werkzaamheden in de kweekcel achtergelaten;
- Uitgebloede bloeiwijzen worden verwijderd voordat zaden gerijpt zijn en verspreid kunnen worden, of
- Indien zaadzetting aan de orde is, worden maatregelen getroffen die passend zijn voor de verspreidingsbiologie van de plant om zaadverspreiding te voorkomen.



Bijlage 5, artikel 5.5: gg planten

- Onderscheid in:
 - bloeiende / niet-bloeiende planten,
 - zelfbestuiver / insectenbestuiver / windbestuiver
 - overige **plantkarakteristieken**
- Risico betreft verspreiding van reproductieve plantendelen: pollen, zaden, vegetatieve delen.
- Inschaling PL-I/PC-I/PK-I (5.5.1) plus aanvullende voorschriften per plantensoort vastgesteld in **bijlage 7**
- Planten i.a.m micro-organismen (PCM-I/PKM-I t/m PCM-IV/PKM-IV):
Inschaling (5.5.3) is naast plantkarakteristieken in principe gebaseerd op de klasse / inschaling van het **micro-organisme**





Bijlage 5, artikel 5.6: gg dieren

- D-I: gericht op het voorkomen van ontsnappen van transgene dieren (5.6.1.a).



Handelingen met genetisch gemodificeerde zoogdieren, vogels, vissen, Xenopus of Drosophila melanogaster die geen genetische informatie bevatten die voor een schadelijk genproduct kan coderen en die niet vervaardigd zijn met behulp van een virale vector.

Bijlage 9 bevat algemene D-I voorschriften en specifieke voorschriften voor *genetisch gemodificeerde zoogdieren, vogels, vissen, Xenopus of Drosophila melanogaster*



Bijlage 5, artikel 5.6: gg dieren

- D-I: gericht op het voorkomen van ontsnappen van transgene dieren (5.6.1.a).
- Dieren i.a.m micro-organismen (DM-I t/m DM-IV):
Inschaling is in principe gebaseerd op de inschaling van het **micro-organisme**:
ML-I → D-I / DM-I (5.6.3.a/b)
ML-II → DM-II (5.6.3.c/d)
- Let op: indien de dierproef zodanig verschilt van de labsituatie dat hieruit additionele risico's voortkomen, bv.: aerogene verspreiding, aanvullende voorschriften of hogere inperking nodig!



Voorbeelden:

- muizen i.a.m adenovirale vector (PG2): DM-II + filtertopkooi (5.6.3.c)
- varkens i.a.m adenovirale vector (PG2): DM-III (5.6.3.d)



Bijlage 5, artikel 5.7: proces-installaties

- Handelingen > 100 liter
- ggo afkomstig van ML-I of ML-II: MI-III (gesloten installatie)
- ggo afkomstig van ML-I:

Voor lagere inperking:

MI-II (lozen, na afdoding)

MI-I (lozen, zonder afdoding)

Toetsing aan **criteria van bijlage 6**



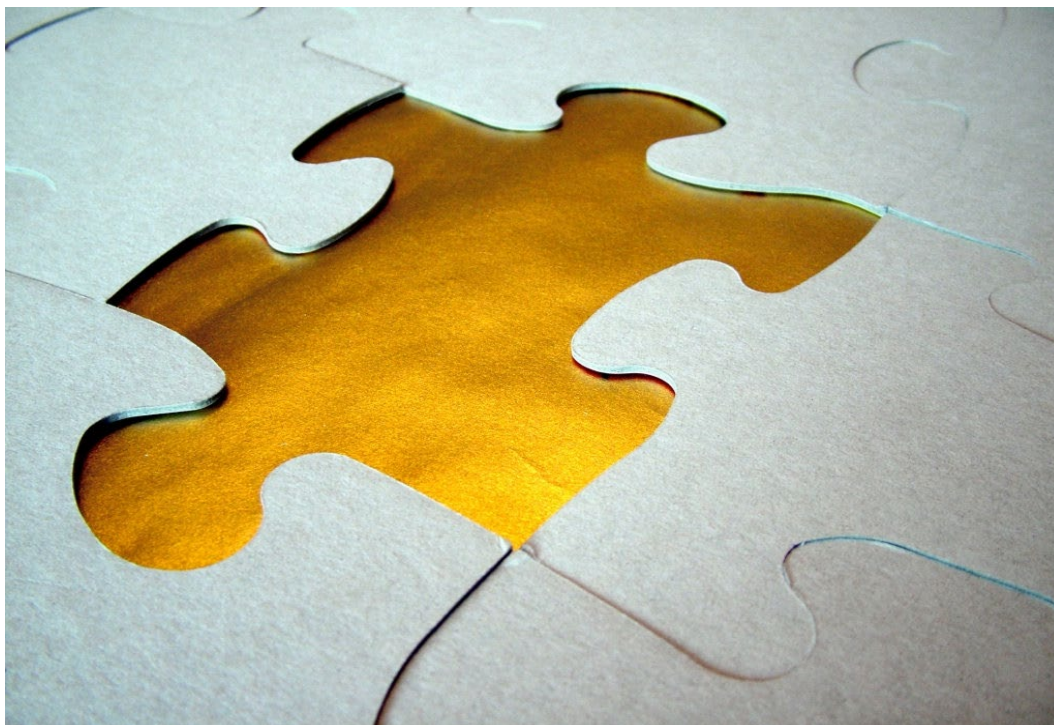


Aandachtspunten

- Altijd blijven nadenken, er zijn gevallen dat de uiteindelijke inschaling hoger uitvalt dan bijlage 5!
- Bijlage 5 dekt niet alle activiteiten met ggo's!
Bv. nieuwe ontwikkelingen, weinig toegepaste activiteiten.
- In deze gevallen zelf risicobeoordeling opstellen (2.8 verzoek):
gebruik bijlage 5 en/of bijlage 8 als stramien om inschaling te bepalen en te onderbouwen.
- Er zijn verschillende hulpmiddelen beschikbaar
- Neem contact met BGGO op bij twijfel over de inschaling.



Vragen?



Bureau GGO:

E-mail: BGGO@RIVM.NL

Telefoon: 030 274 2793