



Huiswerk



1. Klonering in E.coli K12

gastheer: *Escherichia coli* B, K12;
vectoren: vectoren vermeld in bijlage A2, pUC57;
donorsequenties: GFP (*Aequorea victoria*), luciferase (vuurvlieg), toxine (*Corynebacterium diphtheriae*).



5.2. Activiteiten met een genetisch gemodificeerd micro-organisme waarvan de gastheer staat vermeld in bijlage 2 op lijst A1 en de vector staat vermeld in bijlage 2 op lijst A2 of een vector die voldoet aan bepaalde criteria. Deze criteria zijn:

Activiteiten waarbij ongekaracteriseerde donorsequenties worden gebruikt:

- a. De donor bevat een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.
Inschaling: ML-II.
- b. De donor is een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2.
Inschaling: respectievelijk ML-III, ML-II, ML-I.
- c. De donor is een defect, voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2.
Inschaling: respectievelijk ML-II, ML-I, ML-I.
- d. De donor is een niet-viraal pathogeen van respectievelijk klasse 4, 3 of 2.
Inschaling: respectievelijk ML-III, ML-II, ML-I.
- e. De donor is een organisme dat geen schadelijk genproduct bevat.
Inschaling: ML-I.

Activiteiten waarbij gekarakteriseerde donorsequenties worden gebruikt:

- f. De sequentie bevat genetische informatie voor een schadelijk genproduct dat werkzaam kan zijn in deze gastheer.
Inschaling: ML-II.
- g. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2 of voor de vorming van een Adeno-associated dependoparvovirus A of B.
Inschaling: respectievelijk ML-III, ML-II, ML-I, ML-I, ML-I.
- h. De sequentie bevat, in combinatie met sequenties van de gastheer of de vector, genetische informatie voor de vorming van een defect, voor eukaryote cellen infectieus virus van respectievelijk klasse 4, 3 of 2 of voor de vorming van een defect Adeno-associated dependoparvovirus A of B.
Inschaling: respectievelijk ML-II, ML-I, ML-I, ML-I, ML-I.
- i. De sequentie bevat geen genetische informatie die codeert voor een schadelijk genproduct.
Inschaling: ML-I.

Bijlage 5, deel I



5.2. Activiteiten met een genetisch gemodificeerd micro-organisme waarvan de gastheer staat vermeld in bijlage 2 op lijst A1 en de vector staat vermeld in bijlage 2 op lijst A2 of een vector die voldoet aan bepaalde criteria. Deze criteria zijn:

Verkorte tabel bijlage 5 →

5.2		Micro-organisme van bijlage 2 lijst A1 + vector van bijlage 2 lijst A2, of vector voldoet aan gestelde criteria.					
a	f	donor bevat/betreft schadelijk genproduct	ML-	II			
b	g	donor betreft 'eukaryoot' virus,	PG donor:	4	3	2	AAV
			ML-	III	II	I	I
c	h	donor betreft defect 'eukaryoot' virus,	PG donor:	4	3	2	AAV
			ML-	II	I	I	I
d	-	donor betreft niet-viraal pathogeen, donor PG2: schadelijk? 5.4.1.a of contact bggo	PG donor:	4	3	2	
			ML-	III	II	I	
e	i	donor bevat/betreft geen schadelijk genproduct	ML-	I			



Casus 1: klonering in *E. coli*

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
1 Micro-organismen van lijst A1						
Gastheren:	E.coli B, K12	1	5.2.i	n.v.t.	ML-I	
Vectoren:	Vectoren uit de lijst A2 , pUC57	1, 1				
Donorsequenties:	GFP (<i>Aequorea victoria</i>), Luciferase (vuurvlieg)	0, 0				

- *E. coli* B en K12 staan op bijlage 2, lijst A1
- Vectorkaartje van pUC57 meeleveren!

Gastheren:	E. coli K 12	1	5.2.f	n.v.t.	ML-II	Schadelijk genproduct in E.coli
Vectoren:	pUC57					
Donorsequenties:	Toxine (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	2				

- Donorsequentie: gekarakteriseerd, **schadelijk** genproduct: ML-II
- Geen aanvullende voorschriften van toepassing



2. Klonering in een pathogene bacterie

gastheer: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*
subsp. *aureus*;
vectoren: pUC57;
donorsequenties: GFP (*Aequorea victoria*), luciferase (vuurvlieg).



	Nr	Vectoren	PG	A2	toelichting op schadelijke / virale sequenties	vector kaart aanwezig	Micro-orga	Micro-orga	Micro-orga	Micro-orga	Micro-orga	Micro-orga
X	1	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	☒	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
X	2	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	☒	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
X	3	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	☒	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
X	4	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	☒	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
X	5	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	☒	<input type="checkbox"/>
X	6	pUC57	1	☒		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	☒



Casus 2: Pathogene bacteriën

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
2 Micro-organismen van Bijlage 4						
Gastheren:	Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, subsp. aureus	2, 2	5.3.i		ML-II	
Vectoren:	pUC57			?		
Donorsequenties:	GFP (A. victoria) , Luciferase (vuurvlieg)	0, 0				

Micro-organismen staan op bijlage 4 (geen 2.13.a of 2.8 verzoek nodig)

Deel II → Aanvullende voorschriften → Hoe bepaal je die?



Waar vind ik deze informatie?

Pathogeniteitsklasse (PG) e/o verspreidingswijzen van een micro-organisme:

- Ga op zoek op gerenommeerde sites, bijvoorbeeld:

<https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html>

MODE OF TRANSMISSION: *P. aeruginosa* have been found to survive within droplet nuclei and can remain in aerosols for long periods of time, thus there is evidence of potential airborne transmission ²⁰. Contact with contaminated water is also a major route, but since the oral infectious dose is thought to be very high, routes that pose the greatest health risk are skin exposure (for example, in contaminated hot tub water) and lung exposure from inhaling aerosols discharged from infected respiratory tracts ¹³. The bacterial can often enter the body through injuries and wounds ³. The use of contaminated mechanical respiratory ventilators in hospital settings is also a common source of nosocomial infections ¹².

Aanvullende voorschriften in bijlage 9!



5.10.3.a	gg mo: aërogeen verspreidend	ML-	II	9.1.1.3.3.9
5.10.3.b	gg mo: infectieus via wondjes van de huid	ML-	II	9.1.1.3.3.10
5.10.3.c	zwangerschap en activiteiten met spec. gg mo's	ML-	II	9.1.1.3.3.11
5.10.3.d	gg mo: via gebruiksvoorwerpen / fomites verspreidend	ML-	II	9.1.1.3.3.12
5.10.3.e	gg mo: oro-fecaal dan wel oraal verspreidend	ML-	II	9.1.1.3.3.13



9.1.1.3.3.9. Voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die aërogeen kunnen verspreiden

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- b. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

9.1.1.3.3.10. Voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- b. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

9.1.1.3.3.12. Voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die zich via gebruiksvoorwerpen (fomites) kunnen verspreiden

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- b. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

9.1.1.3.3.13. Voor activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen die zich oro-fecaal dan wel oraal kunnen verspreiden

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen.



Casus 2: Pathogene bacteriën

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
2 Micro-organismen van Bijlage 4						
Gastheren:	Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, subsp. aureus	2, 2	5.3.i	5.10.3.a/b/d/e	ML-II	
Vectoren:	pUC57					
Donorsequenties:	GFP (A. victoria) , Luciferase (vuurvlieg)	0, 0				

Weet waarmee gewerkt wordt, pathogeniteitsklasse m.o.:

- Zoek op in literatuur
- Zoek op internet
- Praat met de onderzoeksleiders



3. Transfectie in animale cellen

gastheer: primaire cellen (mens), NIH/3T3, THP-1, **COS-7** ;
vectoren: pcDNA3 (**bevat** SV40 ori), pUC57, pSUPER.neo (**geen** SV40 ori);
donorsequenties: actine (mens, muis).



Casus 3: Transfecties cellen

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
2 animale cellen met DNA (NIET tbv gg-virus)						
Gastheren:	primaire cellen (mens), NIH/3T3, THP-1	' , '	5.4.1.i/h	n.v.t	ML-I	pcDNA3 bevat SV40 ori, maar zit niet in cellen met een defecte SV40. actine heeft geen schadelijke eigenschappen.
Vectoren:	pUC57, pcDNA3, pSUPER.neo	' , '				
Donor-sequenties:	actine (mens, muis)					
3 animale cellen met DNA (NIET tbv gg-virus)						
Gastheren:	COS7		5.4.1.g	5.10.3.a	ML-II	COS7 bevat defect SV40, klasse 2. <u>pcDNA3 bevat SV40 ori.</u> Er zijn viral sequenties aanwezig die kunnen leiden tot de vorming van een virus dat eukaryote cellen infecteert of tot de vorming van virale replicaten. actine heeft geen schadelijke eigenschappen.
Vectoren:	pcDNA3					
Donorsequenties:	actine (mens, muis)					

- Deel II → Aanvullende voorschriften: SV40 wordt aerogeen verspreid!

5.10.2.f	gg Vacciniavirus of Cowpoxvirus	ML-	II	9.1.1.3.3.8
5.10.2.g	gg influenza B virus	ML-	II	9.1.1.3.3.16
5.10.2.h	gg FIV	ML-	II	9.1.1.3.3.17
5.10.2.i	gg <i>Leishmania infantum</i> of <i>Leishmania Mexicana</i>	ML-	II	9.1.1.3.3.18
5.10.3.a	gg mo: <u>aërogeen verspreidend</u>	ML-	II	9.1.1.3.3.9
5.10.3.b	gg mo: infectieus via wondjes van de huid	ML-	II	9.1.1.3.3.10
5.10.3.c	zwangerschap en activiteiten met spec. gg mo's	ML-	II	9.1.1.3.3.11

Verkorte tabel bijlage 5 →



4. Transgene planten

Prei (*Allium porrum*), transgeen gemaakt voor GFP, in plantenkas PKa-I en PKb-I aanmelden en vervolgens zelf bijhouden van nieuwe transgenen.

let op: de planten zullen ook tot bloei worden gebracht



Casus 4: Transgene planten

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
Gastheren:	Allium Porrum (Prei)	0	5.5.1.b	5.11.1.b	Pka-I	gg-allium van verkregen van derden; Planten komen tot bloei en bevatten geen schadelijk genproduct: 9.1.3.1.3.1 (insect) + 9.1.3.1.3.3 (zaad)
Vectoren:						
Donor-sequenties:	GFP (Aequorea victoria)	0				
5 Planten, genetisch gemodificeerd, al dan niet bloeiend, op PL, PC, PKa/b						
Gastheren:	Allium Porrum (Prei)	0	5.5.1.b	5.11.1.b	PKb-I	gg-allium van verkregen van derden; Planten komen tot bloei en bevatten geen schadelijk genproduct: 9.1.3.1.3.2 (zaad)
Vectoren:						
Donor-sequenties:	GFP (Aequorea victoria)	0				

Verkorte bijlage 5 tabel →

5.11 Aanvullende voorschriften voor planten op PL-I/ML-I/PC-I/Pka-I/PKb-I*			
5.11.1.a	(gg-)plant van bijlage 7 met disarmed gg <i>Radiobacter (A. tumefaciens)</i>	wind / zaad	PC- I 9.1.2.1.3.1
5.11.1.b	gg-plant (bloeiend) van bijlage 7	insect / wind / zaad	PKa- I 9.1.3.1.3.1/2 /3
		wind / zaad	PKb- I 9.1.3.2.3.1 /2

Bijlage 7 →

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>Allium ampeloprasum</i> (syn. <i>Allium porrum</i>)	insectenbestuivers en gemakkelijke zaadverspreiders	gemakkelijke zaadverspreiders	windstrooiers: zaden worden door plant 'weggeslingerd'



Bijlage 9: Pka-I vs Pkb-I

- Pkb-I = insectendicht:

9.1.3.2.1. Inrichtingsvoorschriften PKb-I

ruimte

- a. De kas bestaat uit een permanente structuur met wanden, dak en vloer die speciaal geconstrueerd is voor het kweken van planten;
- b. De kas is afsluitbaar;
- c. De kas wordt betreden via een (voor)ruimte met een deur die afsluitbaar is en voorzien is van:
- d. De vloer is zodanig uitgevoerd dat de planten zich niet via de grond kunnen verspreiden;
- e. Alle ventilatieopeningen zijn voorzien van insectendicht gaas.

- Pka-I voorschriften ter voorkoming van verspreiding via insecten noodzakelijk:

9.1.3.1.3.1. Voor activiteiten met genetisch gemodificeerde planten aangeduid als insectenbestuivers

- a. De bloeiwijzen worden insectendicht ingehuld, of
- b. Indien geen insectendichte inhulling plaatsvindt:
 - i. De kas wordt betreden via een (voor)ruimte met een afsluitbare deur en in (voor)ruimte en kas zijn ventilatieopeningen voorzien van insectendicht gaas,
 - ii. Vrij vliegende insecten zijn niet aanwezig, en
 - iii. Indien vliegende insecten nodig zijn voor de bestuiving, bevinden deze zich in een insectendicht afgesloten compartiment.



5. Transgene muizen

Transgene en/of knock-out muis Il2rg (Il2rg) aanmelden en vervolgens zelf bijhouden van nieuwe transgenen. Relevante literatuur waarin de vervaardiging is beschreven moet worden meegestuurd (1e kennisgeving) of opgenomen in het verslag risicobeoordeling (bij nieuw toe te voegen muis na een eerste kennisgeving).



Casus 5: Transgene muizen

Nr	Activiteit	PG	Inschalingsartikel volgens bijlage 5		CFI	Toelichting
			deel I	deel II		
6 Dieren, genetisch gemodificeerd, op D-I						
Gastheren:	Mus Musculus	0	5.6.1.a	n.v.t.	D-I	gg-muizen van verkregen van derden
Vectoren:						
Donor-sequenties:	IL-2Ry	0				

- CFI's voor dieren: D-I, DM-I t/m DM-IV:
 - Hoe zijn deze dieren vervaardigd? Stuur de informatie van de vervaardiging van de gg-muizen mee!
 - > Transgene dieren vervaardigd met plasmide construct (geen virale vector) met onschadelijke sequentie → D-I
 - > Transgene dieren vervaardigd met virale vector afkomstig van ML-II → DM-II
- Indien kennisgeving van niveau I:
 - Wijzigingen zelf bijhouden in eigen administratie (verslag risicobeoordeling VRB);
 - > VRB = eigen administratie en stuur deze NIET naar BGGO;



6. Klonering in een niet geclassificeerde (of onbekende) bacterie

Activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen

gastheer: *Burkholderia sartisoli*

vectoren: pUC57

donorsequenties: GFP (*Aequorea victoria*), luciferase (vuurvlieg)



Casus 6: klonering in een onbekende bacterie

Casus 6: *Burkholderia sartisoli*

- Staat niet op bijlage 2 (apathogeen) of bijlage 4 (pathogeen)
- 2.13a verzoek voor classificatie en plaatsing op bijlage 2 lijst A1.
 - Alle relevante informatie m.b.t. bepaling pathogeniteitsklasse aanleveren (geen linkjes naar sites of publicaties)
 - Besluit op 2.13 ontvangen → activiteiten inschalen conform bijlage 5 → kennisgeving doen



Casus 6: klonering in een onbekende bacterie

Burkholderia sartisoli sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil

Elke Vanlaere,¹ Jan Roelof van der Meer,² Enevold Falsen,³
Joana Falcao Salles,⁴ Evie de Brandt¹ and Peter Vandamme¹

¹Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, B-9000 Gent, Belgium

²Département de Microbiologie fondamentale, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

³Culture Collection, Department of Clinical Bacteriology, University of Göteborg, SE 413 46 Göteborg, Sweden

⁴Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, IFR-41, Université Lyon1, F-69622 Villeurbanne, France

frontiers in
GENETICS

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

published: 19 December 2014
doi: 10.3389/fgene.2014.00429



Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species

Amandeep Sawana, Mobolaji Adeolu and Radhey S. Gupta*



Casus 6: klonering in een onbekende bacterie

Casus 6: *Burkholderia sartisoli*

2.13(a) of 2.8 (combinatie)verzoek?

2.13.(a): in aanmerking komen voor plaatsing op bijlage 2, 4, 7 of 11

2.8 verzoek:

- omlaagschaling: voorstel voor lager inperkingsniveau
- twijfel: tussen twee inperkingsniveau's
- onbekend: niet in te schalen conform bijlage 5

Waarom in dit geval geen 2.8 verzoek?

Een 2.8 verzoek is onhandig. Je organisme komt niet op de bijlage terecht en een wijziging moet via een 2.8 wijziging opnieuw worden besloten



Casus 6: klonering in een onbekende bacterie

Type 2.8 verzoek

Maak een keuze uit de volgende typen 2.8 verzoeken

- Ik twijfel welke uitkomst van de risicobeoordeling volgens bijlage 5 juist is
- Ik wil een lagere inschaling dan de inschaling volgens bijlage 5
- Ik kan geen inschaling doen volgens bijlage 5

Bijlage 5 past niet

Beschrijf de genetisch gemodificeerde organismen door de gastheren-, vectoren- en donorsequenties-tabellen in te vullen. Geef in de activiteitentabel aan in welke categorie van fysische inperking u de werkzaamheden wilt gaan uitvoeren.

Onderbouw de inschaling door middel van een risicobeoordeling:

Beschrijf de voorschriften die gehanteerd worden om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen indien deze nodig zijn:



Take home messages

Formulier compleet invullen:

Vul bijlage 5 deel I (cfi) en II (voor niveau I en II) in!

Vul de CFI in!

Vul de vragen nav de inschalingsartikelen in!

Niet ingevuld = geen risicobeoordeling

Let op aanvullende voorschriften die nodig zijn
(bijlage 5 deel II → bijlage 9)!

Bijzondere activiteiten

Verspreidingswijze mo's en planten;

De gehele lijst van vectoren van bijlage 2 lijst A2 mag niet in pathogenen bacteriën worden toegepast!

Want: de aanwezige antibioticum resistentie genen moet per pathogeen beoordeeld worden!

Let op: de veelgebruikte term 'marker- en reporter genen' kan vragen oproepen.

De gehele lijst van vectoren van bijlage 2 lijst A2 mag niet in cellijnen op ML-I worden toegepast.

Want: sommige cellijnen bevatten wildtype virussen die tot een gg-virus kunnen leiden → ML-II.

De gebruikte vectoren moeten altijd worden gespecificeerd.

Lever bij een 2.13(a) verzoek alle informatie aan.

Verwijzen naar familienaam is niet voldoende!

Als de classificatie nog niet bekend is, heeft alvast een kennisgeving indienen geen zin .



Take home messages

Gebruik de hulpmiddelen op onze website: www.ggo-vergunningverlening.nl

Check ook de toelichtingen op onze website!

Belangrijke informatie altijd meeleveren!

LET OP: geen linkjes of verwijzingen naar papers, maar pdf!

Markeer relevante informatie!
Teveel informatie 'dumpen' zal tot meer vragen leiden.

Lever je formulieren in PDF/A format in!

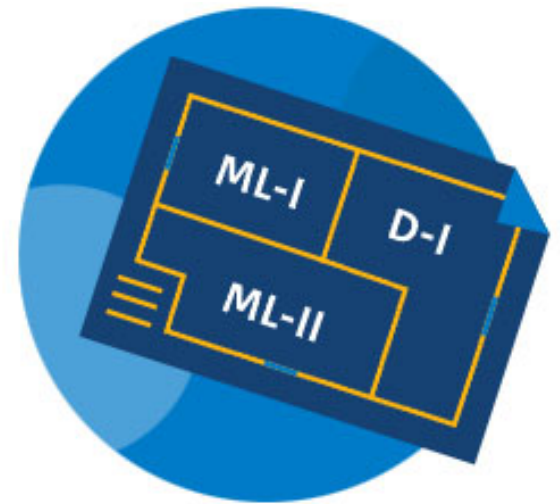
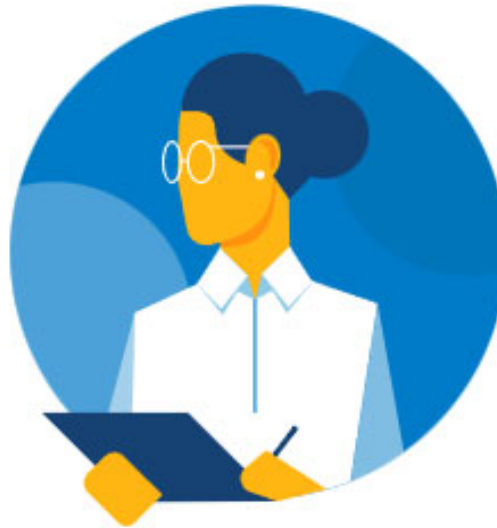
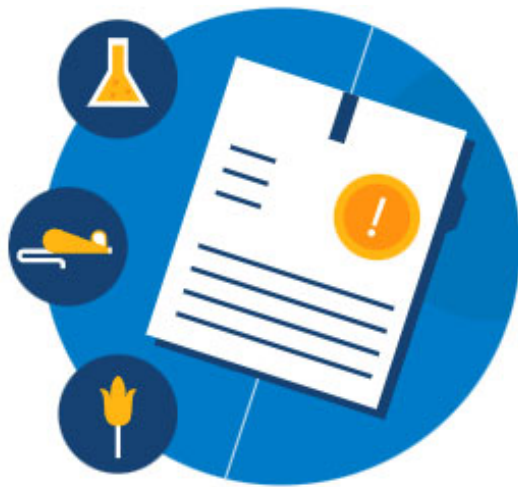
Zorg dat je het onderzoek snapt. Ga in gesprek met de onderzoeker! Wees kritisch en vraag door

BVF is verantwoordelijk voor de risicobeoordeling!

Indien nodig bel BGG0.



De workshops





Interactief: met je groep ga je onder begeleiding van een BGGO medewerker (en ervaren BVF) een project uitwerken en bediscussiëren

Opzet:

Verdeel de groep in BVF's en onderzoekers

Hoe ga je te werk als BVF en wat wordt er van je gevraagd als onderzoeker/VM?

Voer de risicobeoordeling uit

Zie voor hulpmiddelen ook de Tips & Tricks.

Eerste deel 45 minuten

Tweede deel: verdieping, ook 45 minuten

