

INGEKOMEN 23 SEP. 2010

RIVM/SEC/Bureau GGO
Postbus 1
3720 BA BILTHOVEN

Boxmeer, 22 september 2010

Betreft : aanvraag Introductie in het milieu

Geachte mevrouw, heer,

Hierbij doet Intervet International bv een aanvraag Introductie in het milieu voor een veterinaire toepassing van genetisch gemodificeerde organismen.
De aanvraag is getiteld: Live attenuated *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* deletion mutant vaccine (PM-MH) against respiratory disease in cattle.

Doel is het ontwikkelen van een vaccin tegen *Pasteurella* en *Mannheimia* pneumonie in runderen. Om dit vaccin, gebaseerd op deletiemutanten, verder te kunnen ontwikkelen is het nodig om studies met grotere groepen dieren in het veld te kunnen uitvoeren. Hiermee zullen gegevens worden verzameld die nodig zijn voor registratie van het vaccin in de EU.

Met het aanvraagformulier sturen wij 18 bijlagen mee.

Met vriendelijke groet,


Intervet / Schering Plough Animal Health

Cc. 

AANVRAAGFORMULIER INTRODUCTIE IN HET MILIEU:

VETERINAIRE TOEPASSINGEN VAN GENETISCH GEMODIFICEERDE ORGANISMEN

Indien u vragen heeft kunt u contact opnemen met Bureau GGO (email: bggo@rivm.nl, telefoon: 030-2742793).

[Alle informatie die in de aanvraag en de bijlagen wordt verstrekt, wordt voor zover deze niet als vertrouwelijk is aangemerkt, bij de ter inzage legging van de aanvraag en de (ontwerp) beschikking openbaar gemaakt. Van als vertrouwelijk aangemerkte onderdelen moet een openbare samenvatting worden verstrekt, waarin voldoende informatie staat voor een goed algemeen begrip van de aanvraag. Tevens moet schriftelijk gemotiveerd worden waarom bepaalde informatie als vertrouwelijk wordt aangemerkt, hierbij moet aannemelijk worden gemaakt dat het opheffen van de vertrouwelijkheid de concurrentiepositie van de aanvrager schaadt.]

Getracht wordt de uiteindelijke beschikking zodanig op te stellen dat diverse veterinaire protocollen hieronder uitgevoerd kunnen worden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de in deze aanvraag beschreven informatie. Uiteraard moeten deze werkzaamheden passen onder de beschrijving van het experiment en de verstrekte risico-analyse.

Alvorens een dergelijke bredere vergunningaanvraag in te dienen is het aan te raden contact op te nemen met Bureau GGO voor informeel overleg over de mogelijkheden.

Onder de in het formulier genoemde 'proefdieren' wordt verstaan dieren die in het onderzoek opgenomen worden.]

INHOUDSOPGAVE

- A ALGEMENE GEGEVENS**
- B BESCHRIJVING VAN HET GENETISCH GEMODIFICEERDE ORGANISME**
- C MILIEUGERELATEERDE GEGEVENS AFKOMSTIG UIT EERDERE EXPERIMENTEN**
- D PRODUCTIE VAN HET GGO OF NUCLEINEZUUR PREPARAAT**
- E ASPECTEN BEHOREND BIJ DE VETERINAIRE TRIAL**
- F RISICO-ANALYSE**
- G RISICO MANAGEMENT**
- H MONITORING EN AFVALVERWERKING**

INTERNET www.bioveiligheid.nl

AFKORTINGEN

Regeling	Regeling genetisch gemodificeerde organismen
ggo	Genetisch Gemodificeerd Organisme

A. ALGEMENE GEGEVENS

A.1. Titel van de aanvraag:

Live attenuated *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* deletion mutant vaccine (PM-MH) against respiratory disease in cattle.

A.2. Geef een korte inhoudelijke beschrijving van de aanvraag.

PM-MH is a live vaccine for subcutaneous administration to cattle, containing modified (attenuated) versions of the two primary bacterial agents responsible for bovine pneumonic pasteurellosis. The *Pasteurella multocida* strain (\DeltahyaE) has been made acapsular by deleting a portion of the *hyaE* gene, the first gene in the capsule biosynthetic operon. This deletion attenuates the wild-type virulence of the organism. The *Mannheimia haemolytica* strain (Lkt-) has been attenuated by deleting a portion of the leukotoxin A gene, resulting in an ineffective leukotoxin that remains capable of eliciting a protective immune response.

- no genetic material has been inserted
- both deletions are stable after passaging in cattle
- neither strain is shed from subcutaneously vaccinated cattle
- both strains are non-pathogenic in an appropriate range of non-host species
- both strains are susceptible to common antibiotics

The overall risk of introducing the vaccine containing these GMOs to both humans and the environment is essentially zero.

Since the strains have been thoroughly tested in the US, and because they were demonstrated to be safe, we apply for a permit for Introduction in the environment (field studies).

A.3. Geef een korte beschrijving van de voorgenomen werkzaamheden.

The vaccine (subcutaneous route from 8-week-old onwards) was developed and has been thoroughly tested in the US where it currently is in the process of licensing. The vaccine (subcutaneous route) has been tested in calves for efficacy and safety including overdose vaccination, shed and spread studies and back-passage studies (i.e. stability after animal passaging). The vaccine also has been tested in extensive field trials at several different locations in the US.

Besides in the US, Intervet wants to license this product in the EU. Because the requirements for EU-licensing are slightly different from those of the US, several safety studies and field trials have to be repeated. In addition, the strains will also become part of larger live combination vaccines and as a consequence efficacy studies have to be repeated as well. Moreover, in the EU, the vaccine also is intended for intranasal vaccination of young calves (2-week-old).

A.4. Beoogde einddatum:

The end date will be the day of licensing which will be approximately 2014 / 2017.

DOEL VAN DE INTRODUCTIE IN HET MILIEU**A.5. Algemeen doel van de werkzaamheden die worden aangevraagd:**

The most important and final goal is to develop a vaccine against *Pasteurella* and *Mannheimia* pneumonia in cattle i.e. to collect data necessary for product registration.

A.6. Specifiek doel van de werkzaamheden die worden aangevraagd:

The objective is to do efficacy studies, safety studies and field trials in order to collect data for EU registration. Most of the trials have to be performed in colostrum deprived 2-week-old calves implying a logistically difficult operation. After birth calves should not be transported since the stress associated with the transport often activates *Pasteurella* and *Mannheimia* (that are always present at low profile) which may result in seroconversion and failure of the trials. Such experiments can be better planned under conventional housing conditions.

Moreover, containment facilities are less animal friendly and the capacity of containment facilities for cattle is limited and this would significantly delay the time to market.

Since the strains have been thoroughly tested for safety and efficacy in the US we apply for a deliberate release in the environment, i.e. conventional housing after vaccination.

VERGUNNINGAANVRAGER

A.8. Rechtspersoon:
Intervet International BV

A.9. Afdeling/vakgroep:
Directie

A.10. Correspondentieadres:
Postbus 31

A.11. Postcode en plaatsnaam:
5830AA Boxmeer

A.12. Telefoonnummer:
0485 587500

VERANTWOORDELIJK MEDEWERKERS (VM)

VERANTWOORDELIJK MEDEWERKER VOOR WERKZAAMHEDEN ANDERS DAN DE VETERINAIRE TOEPASSING VAN HET GGO (VM-I)

A.13. Titel, voorletter, voorvoegsel, achternaam:

A.14. Instelling/bedrijf:
Intervet International BV

A.15. Afdeling/vakgroep:
D&T

A.16. Correspondentieadres:
Postbus 31

A.17. Postcode en plaatsnaam:
5830AA Boxmeer

A.18. Telefoon- en faxnummer:

[REDACTED]

A.19. E-mail adres:

[REDACTED]

**VERANTWOORDELIJK MEDEWERKER VOOR DE VETERINAIRE TOEPASSING VAN HET
GGO (VM-II)**

A.20. Titel, voorletter, voorvoegsel, achternaam:

[REDACTED]

A.21. Instelling/bedrijf:
Intervet International BV

A.22. Afdeling/vakgroep:
Microbiological R&D

A.23. Correspondentieadres:
Postbus 31

A.24. Postcode en plaatsnaam:
5830AA Boxmeer

A.25. Telefoon- en faxnummer:

[REDACTED]

A.26. E-mail adres:

[REDACTED]

MILIEUVEILIGHEIDSFUNCTIONARIS (MVF)

A.27. Titel, voorletter, voorvoegsel, achternaam:

[REDACTED]

[REDACTED]

- A.28. Instelling/bedrijf:**
Intervet International BV
- A.29. Afdeling/vakgroep:**
Safety, Health, Environment (SHE)
- A.30. Correspondentieadres:**
Postbus 31
- A.31. Postcode en plaatsnaam:**
5830AA Boxmeer
- A.32. Telefoonnummer:**
[REDACTED]
- A.33. E-mail adres:**
[REDACTED]

PLAATS VAN UITVOERING

- A.34. Op welke locaties wordt de voorgenomen toepassing uitgevoerd:**
De proeven zullen worden uitgevoerd op conventionele dierverspreiden van Intervet in Nederland en nog te selecteren particuliere locaties in Nederland.

ONDERTEKENING

Namens de Rechtspersoon

Naam: [REDACTED]

datum

16-sept-2010

MVF

Naam: [REDACTED]

datum

16-sept-2010

VM I (niet veterinaire toepassing)

Naam: [REDACTED]

datum

09-sept-2010

VM II (veterinaire toepassing)

Naam: [REDACTED]

datum

9 Sep 2010



B. Beschrijving van het genetisch gemodificeerde organisme

B.1. Geef aan waaruit het genetisch gemodificeerde organisme dat aan de proefdier wordt toegediend bestaat.

Bacterial strain, *Pasteurella multocida* deletionmutant and *Mannheimia haemolytica* deletion mutant.

B.3. BACTERIËLE STAMMEN

BACTERIESTAM WAARVAN HET GENETISCH GEMODIFICEERDE ORGANISME IS AFGELEID

B.3.1. Tot welke bacteriesoort behoort de stam die is gebruikt als uitgangsstam bij de constructie van het GGO.

Pasteurella multocida, strain P1062
Mannheimia haemolytica, strain D153

B.3.2. Is de uitgangsstam een GGO.

Both: no

B.3.3. Wat is de natuurlijke niche van de bacteriestam.

Pasteurella multocida

Pasteurella multocida can be found as a commensal organism in the respiratory and digestive tracts of a wide range of domestic and wild animals worldwide. *P. multocida* serotype A is a common secondary invader in respiratory disease in ruminants. The lungs of animals subjected to environmental stress as well as concurrent or prior infection by viruses or *M. haemolytica*, can be colonized by *P. multocida*. Once established in the lung, *P. multocida* can cause chronic or severe and often fatal pneumonia. *P. multocida* serotype A has been associated with atrophic rhinitis, fowl cholera and respiratory disease in ruminants. However, most *P. multocida* isolates appear to be specialized for virulence in the host of isolation and do not appear to be able to cause disease in a wide range of species. The parent strain (NADC-1062) was isolated in the USA from lung tissue of a calf that died of pneumonia.

Mannheimia haemolytica

The host range of *Mannheimia haemolytica* biotype A serotype 1 (abbreviated to A1) is strictly limited to ruminants. *M. haemolytica* A1 isolates appear to be host specific and neither bovine or ovine isolates readily cause disease in other species. Although *M. haemolytica* is commonly found in the upper respiratory tract (URT) of healthy cattle, exposure of cattle to environmental, managerial, or viral stressors leads to an explosive proliferation and colonization of *M. haemolytica* serotype A1 in all areas of the upper respiratory tract. This heavily colonized URT then becomes the source for lung exposure via aspiration of nasopharyngeal secretions which



ultimately leads to the fibrinonecrotic pleuropneumonia commonly associated with *M. haemolytica*.

The parent strain (NADC-D153) was isolated in the USA from lung tissue of a calf that died of pneumonia.

B.3.4. Geef relevante gegevens over pathogeniteit en eventuele attenuering en biologische inperking van de uitgangsstam.

Pasteurella multocida

The parent (1062) strain was isolated prior to 1962 from the lung of a calf affected with shipping fever, and is distributed by the USDA for use in challenge experiments in cattle. Rhoades and Rimler (1993) compared the virulence of *P. multocida* P-1062 with that of a similar *P. multocida* isolated from the liver of a turkey with fowl cholera (P-1059). In this study *P. multocida* P-1062 was demonstrated to be avirulent in turkeys and did not appear to replicate well in these birds.

Rhoades, K.R. and Rimler, R.B. (1993). *Pasteurella multocida* virulence factors: selection of fowlcholera-inducing strains and non-inducing strains. *Avian Diseases* **37**:1071-1073.

Mannheimia haemolytica

The parent strain (NADC-D153) was isolated in the USA from lung tissue of a calf that died of pneumonia. No more information is available than that it is a normal virulent wildtype strain.

B.3.5. Geef informatie over voortplanting en overleving van de bacteriestam in natuurlijke gastheren.

Pasteurella multocida

Species of the family Pasteurellaceae do not form spores and therefore the bacterium has limited survival in the environment. In cattle these bacteria are passed generally nose to nose through the respiratory tract. An increase in bacterial disease is associated with stress, such as management changes and rapid changes of temperature and housing. There is some effect of season but this is primarily due to weather and management changes.

The parental *Pasteurella multocida* strain 1062 is capable of replication in the bovine lung, and can be used for experimental challenge of cattle. The parent strain 1062 was demonstrated to be avirulent in turkeys.

Pasteurella multocida has been identified as responsible for disease in a wide range of species. However the species is further divided into subspecies and serotypes.

Serotypes A1 and A3 are generally associated with pneumonia in cattle.

Characterisation by capsular PCR typing of 153 isolates from England and Wales collected from 1989 - 1999 indicated a limited degree of strain diversity between the bovine isolates. Comparison to avian, porcine and ovine isolates indicated that there could be some transmission between cattle and poultry and pigs indicated by closely related strains isolated from all 3 species (Davies *et al.*, 2004). Assessment of human isolates of *P. multocida* indicate that the majority of human infections are related to infection from cat and dog related injuries (Weber *et al.*, 1984). Further analysis of the genetic diversity of isolates from different species have grouped the isolates into lineages (Davis *et al.*, 2004). From these studies Davis *et al.* has

concluded that the isolates from cats are similar to lineage of avian isolates. Since the parental organism was a field isolate originally cultured from pneumonic bovine lung tissue it is considered unlikely that it could readily spread to and cause disease in humans, but could potentially spread to other ruminants.

Davis, R.L., MacCorquodale, R. and reilly, S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.* **99**:145-158.

Weber, D.J., Wolfson, J.S., Swartz, M.N. and Hooper, D.C. (1984). *Pasteurella multocida* infections: Report of 34 cases and review of the literature medicine. **63**:133-154.

Mannheimia haemolytica

Mannheimia haemolytica also belongs to the family of Pasteurellaceae who do not form spores and therefore the bacterium has limited survival in the environment. In cattle these bacteria are passed generally nose to nose through the respiratory tract. An increase in bacterial disease is associated with stress, such as management changes and rapid changes of temperature and housing. There is some effect of season but this is primarily due to weather and management changes.

The parental organism for this vaccine is *Mannheimia haemolytica* biotype A, serotype 1. It has been identified as strain NADC-D153. It is a field isolate that was originally cultured from bovine pneumonic lung tissue at the National Animal Disease Center in Ames, IA.

The host range of *Mannheimia haemolytica* biotype A serotype 1 (abbreviated to A1) is strictly limited to ruminants. *M. haemolytica* A1 isolates appear to be host specific and neither bovine nor ovine isolates readily cause disease in other species.

Although *M. haemolytica* possesses an array of potential virulence factors, a large body of evidence points to the leukotoxin (Lkt) as one of the most important factors contributing to lung injury. Leukotoxin is only cytolytic to ruminant leukocytes and platelets (2, 4, 12), and is presumed to destroy leukocytes at the site of infection, thus reducing the animal's capacity to launch an effective immune response. Several observations point to an important role of Lkt in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. First, in experimental pasteurellosis with cattle, the clinical and pathophysiologic events are dose-dependently reproduced by intratracheal or intrapulmonic administration with the live logarithmic phase of *M. haemolytica* as opposed to stationary phase organisms (1, 10). This enhanced pathogenicity may be related to the amount of Lkt and other virulence determinants produced by these different bacterial populations as it has been demonstrated that logarithmic phase cells produce far greater amounts of Lkt than stationary cells (2, 13). Second, other studies have shown that cattle with high Lkt neutralizing antibody titres have higher resistance to the natural disease and experimental pneumonic pasteurellosis than animals with low antibody titers (5, 7). Third, the presence of Lkt in situ in acute pneumonic lesions from *M. haemolytica*-induced experimental pneumonic pasteurellosis and from natural disease (15) has been previously demonstrated. Fourth, a Lkt-rich, cell-free vaccine prepared from actively growing *M. haemolytica* has been demonstrated to induce serum neutralizing antibodies to the Lkt as well as serotype-specific agglutinating antibodies (9). Calves immunized against the Lkt and soluble cell surface antigens contained in the vaccine are protected against *M. haemolytica* challenge whereas non-immunized calves succumb to fibrinous



pneumonia (14). Finally, studies with the mutant *M. haemolytica* strain S9B0071, which does not produce detectable Lkt have demonstrated reduced virulence in both goats and cattle in comparison with the parent wild-type strain (11). Both reduced mortality and reduced lung lesion scores were found following infection with doses of the mutant strain that exceeded the parent wild-type challenges by as much as 1,000-fold (11).

1. **Ames, T. R., R. J. F. Markham, J. Opuda-Asibo, J. R. Leininger, and S. K. Maheswaran.** 1985. Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can. J. Comp. Med.* **49**:395-400.
2. **Baluyut, C. S., R. R. Simonson, W. J. Bemrick, and S. K. Maheswaran.** 1981. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **42**:1920-1926.
3. **Chidambaram, M., B. Sharma, S. F. Petras, C. P. Reese, S. Froshauer, and G. M. Weinstock.** 1995. Isolation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* **63**:1027-1032.
4. **Clinkenbeard, K. D., and M. L. Upton.** 1991. Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **52**:453-457.
5. **Confer, A. W., R. J. Panciera, and D. A. Mosier.** 1988. Bovine pneumonic pasteurellosis: Immunity to *Pasteurella haemolytica*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **193**:1308-1313.
6. **Frank, G. H. and P. C. Smith.** 1983. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res.* **44**:981-985.
7. **Gentry, M. J., A. W. Confer, and R. J. Panciera.** 1985. Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **9**:239-250.
8. **Gonzalez, C. T., S. K. Maheswaran, and M. P. Murtaugh.** 1995. *Pasteurella haemolytica* serotype 2 contains the gene for a noncapsular serotype 1-specific antigen. *Infect. Immun.* **63**:1340-1348.
9. **Jim, K., T. Guichon, and G. Shaw.** 1988. Protecting feedlot calves from pneumonic pasteurellosis. *Vet. Med.* **83**:1084-1087.
10. **Panciera, R. J., and R. E. Corstvet.** 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: Model for *Pasteurella haemolytica*- and *Pasteurella multocida*-induced pneumonia in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **45**:2532-2537.
11. **Petras, S. F., M. Chidambaram, E. F. Illyes, S. Froshauer, G. M. Weinstock, and C. P. Reese.** 1995. Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect. Immun.* **63**:1033-1039.
12. **Shewen, P. E., and B. N. Wilkie.** 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* **35**:91-94.
13. **Shewen, P. E., and B. N. Wilkie.** 1985. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am. J. Vet. Res.* **46**:1212-1214.
14. **Shewen, P. E., and B. N. Wilkie.** 1988. Vaccination of calves with leukotoxin culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Canad. J. Vet. Res.* **52**:30-36.
15. **Whiteley, L. O., S. K. Maheswaran, D. J. Weiss, and T. R. Ames.** 1990. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine pasteurella pneumonia. *Vet. Pathol.* **27**:150-161.

B.3.6. Wat zijn de mogelijkheden voor overleving, vermenigvuldiging en verspreiding onder milieumomstandigheden anders dan in natuurlijke gastheren.

Both *Mannheimia* and *Pasteurella* are highly host adapted and host dependent and have no traits to survive outside the host. Both bacteria (as all members of the *Pasteurellaceae*) do not form spores and therefore they have limited survival in the environment. In cattle these bacteria are passed generally nose to nose through the respiratory tract. An increase in bacterial disease is associated with stress, such as viral priming, management changes and rapid changes of temperature and housing.



There is some effect of season but this is primarily due to the weather and management changes.

M. haemolytica is ruminant specific and although *P. multocida* has a wider species range, strains do tend to be species specific.

B.3.7. Kan de stam genetisch materiaal uitwisselen met andere organismen.

Horizontal gene transfer has never been reported for the *M. haemolytica* D153 strain. Plasmids were not historically associated with members of the Pasteurellaceae family, although tetracycline resistance has been reported with more recent isolates. However, more recently a plasmid containing resistance to streptomycin, spectinomycin, ampicillin and carbenicillin was reported in an avian isolate from Taiwan (Wu *et al*, 2003), and a small plasmid containing genes for resistance to Spectinomycin and Streptomycin in a bovine isolate from Belgium (Kehrenberg *et al*, 2005). In contrast the *P. multocida* P-1062 parent was isolated prior to 1962 and no antibiotic resistances or plasmids have been identified with this organism. In relation to this it should be noted that the GMO is a deletant so there is no additional genetic material being incorporated which could be transferred.

Wu, J.R., Shieh, H.K., Shien, J.H., Gong, S.R. and Chang, P.C. (2003). Molecular characterization of plasmids with antimicrobial resistant genes in avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases* **47**:1384-1392.

Kehrenberg, C., Catry, B., haesenbrouck, F. de kruif, A. and Schwarts. (2005). Novel spectomycin/streptomycin resistance gene aadA14 from *Pasteurella multocida*. *Agents Chemother.* **49**:1384-1392.

DE GENETISCH GEMODIFICEERDE BACTERIE

B.3.8. Is bij de genetische modificatie gebruik gemaakt van een vector.

Yes, vectors were used, but in the vaccine strains there is no vector derived DNA left. It was removed during the construction process.

B.3.9. Geef een beschrijving van de structurele genen en regulatoire sequenties die aanwezig zijn in de vector en in het in de vector geïnserteerde DNA.

Pasteurella multocida

The method used was deletion (and consequential insertion). During the deletion process, three 8bp SmaI linkers (*Serratia marcescens*) were inserted into the deletion site of the *hyaE* gene to ensure that the mutation would result in an acapsular phenotype, but the 8 additional amino acids do not encode a functional protein.

The *P. multocida* serogroup A capsule consists of hyaluronic acid, a polymer of alternating sugars, D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine. The *P. multocida* A: 3 capsule biosynthetic locus consists of three distinct regions. Region 1 encodes for four products that serve as transporters of polysaccharide to the bacterial surface. Region 2 encodes for five genes, *hyaE*, *hyaD*, *hyaC*, *hyaB* and *hyaA*, whose products synthesize the two polysaccharide monomers of the capsule. Region 3 is comprised of two open reading frames (ORFs) whose products are involved in phospholipid substitution.



The structural portion of the *hyaE* gene (including the start and stop codons; 1,869 bp) was obtained by PCR and ligated into the cloning vector pCR2.1. The specific 366 bp deletion within the *hyaE* gene was achieved by PCR, followed by EcoR V restriction digestion to remove specific sequences from the ends. The resulting fragment was then ligated on itself to generate an in-frame deletion excising nucleotides 718 through 1084. An 8 bp Sma I linker (5'-CCCCGGGG-3') was to be inserted into the EcoR V deletion site to ensure that the mutation would result in an acapsular phenotype. However, during the process in fact three Sma I linkers were inserted. The mutated *hyaE* fragment was subcloned into plasmid pBCSK followed by insertion of the Tn903 kanamycin resistance element (pBCSK Δ *hyaEkan*^r). Construction of the replacement plasmid was completed by ligating the Δ *hyaEkan*^r fragment with the 1.2 kb temperature-sensitive origin of replication of pBB192. Because the ColE1 origin of replication is inactive in *P. multocida*, only the ligation products generating plasmids p192ori Δ *hyaEkan*^r were capable of replicating within the host.

The replacement plasmid was introduced into *P. multocida* 1062 by electroporation. Cells possessing integrated plasmid survived antibiotic selection at the non-permissive temperature for plasmid replication, and could be identified because integration of replacement plasmid resulted in an acapsular phenotype.

Mannheimia haemolytica

The genetic organization of the secreted leukotoxin is comprised of four genes: *lktA*, *lktC*, *lktB*, and *lktD*. The *lktA* gene encodes the toxin, *lktC* encodes a protein that post-translationally activates the toxin, and the *lktB* and *lktD* gene products are required for leader-independent transport of Lkt from the cell.

A 3.15 kb EcoRV fragment containing *lktC* and approximately 75% of the *lktA* coding region was cloned into the unique EcoRV site of the cloning vector pBB80C. Using the two unique NgoM IV restriction enzyme sites in the *lktA* gene, a 1033 bp fragment was removed near the N-terminal coding region of that gene. Plasmid pBB80C, a temperature sensitive plasmid, was electroporated into the D153 serotype A1 strain, and isolates were selected for lack of hemolytic activity on blood agar plates indicating attenuation of the *lktA* gene.

Methods used to construct and introduce the insert(s) into the recipient or to delete a sequence:

D153 cells were electroporated with temperature-conditional plasmid vectors containing deleted clones of the *lktA* gene.

The shuttle plasmid pBB80C Δ *lktA* was methylated in vitro with HhaI methyltransferase and electroporated into the D153 parent strain. Transformants were grown with antibiotic selection at a permissive temperature for replication (30°C) then passed to a non-permissive temperature (40°C) on selective solid medium. Colonies were then selected and grown overnight at the permissive temperature but without selection and then streaked for isolation on non-selective media. At this point, the plasmid is completely lost. Colonies were screened by PCR for the loss of the deleted segment of the *lktA* gene, and strains containing the deleted *lktA* alleles were recovered. The resulting deletants have no plasmids, residual pieces of DNA from the cloning process, or any inserted foreign or heterologous nucleic acids.

B.3.10. Vat de gegevens onder B.3.8 en B.3.9 samen in een schematische weergave ('kaart') van het genetisch gemodificeerde organisme.

See addendum 17 en 18

B.3.11. Welke fysiologische (daaronder mede begrepen ziekteverwekkende) effecten kan de genetisch gemodificeerde bacterie veroorzaken; welke behandelingen zijn beschikbaar.

The deletion mutants are unable to induce physiological effects. The deleted genes encode for virulence determinants which now are lacking. As a consequence the vaccine strains are attenuated and much less virulent and less capable to survive in the host.

B.3.12. Geef aan in hoeverre het gastheerbereik van de genetisch gemodificeerde bacterie gewijzigd is of kan zijn ten opzichte van de uitgangsstam.

The deleted genes encode for virulence determinants which now are lacking. As a consequence the vaccine strains are attenuated and much less virulent and less capable to survive in the host.

B.3.13. Geef aan via welke routes de genetisch gemodificeerde bacterie zich kan verspreiden.

M. haemolytica Lkt- and *P. multocida* Δ *hyaE* dissemination in host and shed/spread studies have shown that following subcutaneous vaccination in the neck, the GMOs remain at the site of injection or migrate to the pre-scapular lymph node. No dissemination beyond the draining lymph node was detected, and the deletion strains were cleared from the injection site within 3 weeks post-vaccination. The studies also demonstrated an inability of the deletion strains to be shed from calves vaccinated subcutaneously with 10x the recommended dose and spread to other susceptible calves. There was no bacterial isolation from nasal swabs and no sero-conversion in the contact control calves.

Therefore, the GMOs will not enter the environment via subcutaneously vaccinated animals. Vaccine may potentially be released as a result of accidental breakage/spillage of the vaccine during administration.

The intranasal vaccination route will also be investigated. Via that route shedding to the environment and contact animals will occur.

However, the overall risk of administration of the vaccine to susceptible animals and possible entrance into the environment is nearly zero, because these vaccine strains cannot survive outside the host and because these are deletion mutants.

**C. MILIEUGERELATEERDE GEGEVENS AFKOMSTIG UIT EERDERE EXPERIMENTEN****C.1. Geef een beschrijving van de resultaten welke afkomstig zijn uit eerdere studies met het GGO, en die van belang zijn voor de milieurisicobeoordeling.**

The vaccine has been thoroughly tested for efficacy and safety in the US. Below is a summary of the trials. The summary pages of these studies are included in this application.

Studies done with the individual vaccine strains: M. haemolytica lkt-

- 1 Mouse LD50 study (IP inoculation) with *M. haemolytica lkt-* demonstrated that the deletion mutant was less virulent compared with the D153 parent strain. See Addendum 1.
- 2 Calf safety study subcutaneous and intranasal inoculation with *M. haemolytica lkt-* showed that the vaccine strain is safe by both inoculation routes. The study also showed that the intranasally vaccinated calves shed vaccine strain and spread to contact animals. See addendum 2.
- 3 Sheep safety study intranasal inoculation (20x expected field dose) with *M. haemolytica lkt-* showed that the vaccine strain is safe. The study also indicated that there is only low risk associated with propagation of *M. haemolytica lkt-* vaccine strain in the environment via sheep. See addendum 3.
- 4 Reversion to virulence study following animal passage with *M. haemolytica lkt-* showed that the vaccine strain is phenotypically (remained haemolytic) and genetically (retained the deletion) stable during five animal passages. No significant increase or difference in clinical signs or lung lesion scores were found between passage 1 to 5. See addendum 4.
- 5 Shedding, spreading and dissemination study with *M. haemolytica lkt-* following subcutaneous inoculation showed that the vaccine strain is safe at 10x the expected field dose and that tissue tropism of the vaccine strain is isolated to the injection site with no evidence of migration to the lungs. The study also showed that the vaccine strain is not shed from vaccinated animals. See addendum 5.

Studies done with the individual vaccine strains: P. multocida ΔhyaE

- 6 Mouse LD50 study (IP inoculation) with *P. multocida ΔhyaE* demonstrated that the deletion mutant was less virulent compared with the 1062 parent strain. See Addendum 6.

- 7 Rabbit safety study intranasal inoculation (>10x expected field dose) with *P. multocida* Δ *hyaE* showed that the vaccine strain is safe. The study also indicated that there is only low risk associated with propagation of *P. multocida* Δ *hyaE* vaccine strain in the environment via rabbits. See addendum 7.
- 8 Chicken safety study intranasal inoculation (12x expected field dose) with *P. multocida* Δ *hyaE* showed that the vaccine strain is safe. The study also indicated that there is only low risk associated with propagation of *P. multocida* Δ *hyaE* vaccine strain in the environment via chickens. See addendum 8.
- 9 Sheep safety study intranasal inoculation (14x expected field dose) with *P. multocida* Δ *hyaE* showed that the vaccine strain is safe. The study also indicated that there is only low risk associated with propagation of *P. multocida* Δ *hyaE* vaccine strain in the environment via sheep. See addendum 9.
- 10 Calf safety study subcutaneous inoculation with *P. multocida* Δ *hyaE* showed that the vaccine strain is safe to use at a dose of 5×10^8 CFU. At a 10x higher subcutaneous dose the inoculation produces fever, lethargy, rapid breathing and large injection site reactions. No indication for shedding after subcutaneous vaccination was found See addendum 10.
- 11 Shedding, spreading and dissemination study with *P. multocida* Δ *hyaE* following subcutaneous inoculation showed that the vaccine strain is safe at >10x the expected field dose and that tissue tropism of the vaccine strain is isolated to the injection site with no evidence of migration to the lungs. The study also showed that the vaccine strain is not shed from vaccinated animals. See addendum 11.
- 12 Reversion to virulence study following animal passage with *P. multocida* Δ *hyaE* showed that the vaccine strain is phenotypically (remained acapsular) and genetically (retained the deletion) stable during five animal passages. No significant increase or difference in clinical signs or lung lesion scores were found between passage 1 to 5. See addendum 12.

Studies done with the vaccine containing *M. haemolytica* lkt- and *P. multocida* Δ *hyaE*

- 13 Efficacy study of live subcutaneous PM-MH vaccine in calves against transtracheal challenge with virulent *M. haemolytica* challenge showed significant 90% reduction in clinical signs and pneumonia. See addendum 13.
- 14 Efficacy study of live subcutaneous PM-MH vaccine in calves against transtracheal challenge with virulent *P. multocida* challenge showed significant 78% reduction in clinical signs and pneumonia. See addendum 14.
- 15 Safety study with live subcutaneous PM-MH vaccine in calves: single dose, 10x overdose and repeated dose demonstrated that the vaccine is safe to use in 7-8 week-old calves. See addendum 15



- 16 Field trial with live subcutaneous PM-MH vaccine in calves (n=803) at three different locations in three different states in the US demonstrated that the vaccine is safe to use in 4-8 week-old calves under field conditions. See addendum 16

D. PRODUCTIE VAN HET GGO OF NUCLEINEZUUR PREPARAAT

D.1. Geef aan onder welke verantwoordelijkheid productie van het GGO of nucleïnezuur preparaat wordt uitgevoerd.

The GMOs will be produced at Intervet-SPAH, Boxmeer, The Netherlands.

D.2. In welke stappen van de productie vindt kwaliteitscontrole plaats, welke testmethoden worden gebruikt en hoe worden de tests uitgevoerd.

De bacteriën worden gegroeid op vloeibaar medium. Naar gelang de schaal wordt de vloeibare cultuur doorgeënt. Na de groei wordt de cultuur gemengd met een vriesdroogstabilisator en worden de bacteriën gevriesdroogd. QC testen op het eindproduct bestaan uit: restvocht, reinheid, levendtelling, determinatie, een PCR ter bevestiging van de deletie.

D.3. Welke criteria worden aan een batch van het GGO gesteld voordat deze wordt vrijgegeven voor de onderhavige toepassing.

Een aantal flacons met gevriesdroogd vaccin worden geresuspendeerd in water en een verdunningsreeks wordt uitgeplaat op bloed agar platen. Na 1-2 dagen worden de platen gecontroleerd op reinheid. Er mogen alleen *P. multocida* en *Mannheimia haemolytica* bacteriën op de platen zitten. Bovendien worden de kolonies geteld op de platen. Een batch wordt alleen vrijgeven als er een vastgesteld aantal CFU per dosis vaccin in de flacon zitten. Verder worden enkele kolonies van de plaat genomen en gebruikt in deletie specifieke PCR's. Als laatste wordt ook nog een determinatie analyse ingezet om aan te tonen dat we te maken hebben met *P. multocida* en *M. haemolytica*.

**E. ASPECTEN BEHOREND BIJ DE VETERINAIRE TRIAL**

- E.1. Hoeveel proefdieren zullen opgenomen worden in het onderzoek.**
Afhankelijk van het verloop van de proeven 500-4000.
- E.2. Welke doses worden toegediend en op welke tijdstippen gedurende de studie vindt toediening plaats.**
Doseringsen variëren van 10^5 CFU tot 10^9 CFU; waarbij een tot twee doseringen gegeven worden. In het geval van twee doseringen gebeurt dit met een interval van 2-4 weken. Kalveren zullen gevaccineerd worden op een leeftijd van 1-16 weken.
- E.3. Op welke wijze wordt het GGO preparaat aan het proefdier toegediend.**
Subcutaan vanaf 3w leeftijd of Intranasaal vanaf 1 week leeftijd.
- E.4. Worden er monsters van het proefdier genomen die GGO's (kunnen) bevatten, en welke tests worden hiermee uitgevoerd.**
Na de challenge kunnen er neusswabs genomen worden, om de challenge stam aan te tonen. Na subcutane vaccinatie is de kans zeer klein dat er GGO's in deze neusswabs zitten. Na Intranasale vaccinatie is de kans zeer reëel dat daar GGO in zit.
Verder worden ook bloed (serum) monsters genomen voor antilichaam titraties. De kans dat daar GGO in zit is heel erg klein zowel na subcutane als na intranasale vaccinatie. Beide bacteriën (wildtype) zijn normaal gesproken niet in staat een systemische infectie te veroorzaken (wel lokaal, zoals pneumonie of wondinfectie).
- E.5. Worden de proefdieren in isolatie gehouden of komen de proefdieren na behandeling met het GGO in contact met dieren die geen deel uitmaken van de onderhavige studie. Welke criteria worden gehanteerd voor het al dan niet implementeren van isolatie maatregelen.**
Omdat 1) de vaccinstam sterk geattenuëerd is in de gastheer en 2) *P. multocida* en *M. haemolytica* moeilijk kunnen overleven buiten de gastheer en 3) het om "schone" deletie mutanten gaat, zijn de milieu risico's nihil. Daardoor zullen geen verdere isolatiemaatregelen geïmplementeerd te hoeven worden.
De dieren worden gehouden volgens de normale farm routines. De dieren worden echter altijd in stallen of afgerasterde weilanden gehouden en zijn als zodanig fysisch ingeperkt en komen gedurende de proef niet in aanraking met dieren die geen deel uitmaken van de studie.

**F. RISICO-ANALYSE****F.1. Geef aan volgens welk scenario het genetisch gemodificeerde organisme en/of een afgeleide van het nucleïnezuur preparaat zich vanuit het proefdier kan verspreiden in het milieu.**

Na subcutane toediening is de kans zeer klein dat de vaccinstammen in het milieu terecht komen. De bacteriën blijven slechts tijdelijk op de injectie plaats aanwezig en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam.

Vaccinstammen kunnen vrijkomen na intranasale vaccinatie. Het risico hiervan is echter zeer beperkt, omdat uitgebreid aangetoond is dat de stammen geattenuëerd en veilig zijn voor dieren, maar bovenal omdat we hier te maken hebben met schone deletie mutanten. Indien een wildtype bacterie de deletie zou overnemen dan verandert er niets aan het milieu omdat de mutant dan wildtype wordt en de wildtype een mutant.

Het is hierbij van belang te weten dat beide bacteriën in bijna alle gezonde herkauwers in kleine aantallen voorkomen in de bovenste luchtwegen als commensale opportunisten. Pas na bepaalde stress situaties kunnen ze zich goed prolifereren en klinische infectie veroorzaken.

F.2. Geef aan welke mogelijke nadelige effecten gepaard kunnen gaan met blootstelling van mens of milieu aan het GGO.

Omdat de vaccinstammen deletie mutanten zijn die geattenuëerd en veilig zijn gebleken, en omdat het schone deletie mutanten zijn, is er geen kans dat deze ziekte veroorzaakt. Indien een wildtype bacterie de deletie zou overnemen dan verandert er niets aan het milieu omdat de mutant dan wildtype wordt en de wildtype een mutant, met inperkende eigenschappen als hierboven beschreven.

Er is geen risico op nadelige effecten voor mens of milieu.

F.3. Geef een inschatting van de kans dat de in F.2. beschreven nadelige effecten ook daadwerkelijk kunnen optreden.

Een inschatting kan niet gemaakt worden omdat er geen nadelige effecten zijn. (zie F1 en F2)

F.4. Beschrijf de risico's die op kunnen treden ten gevolge van de toepassing van het GGO.

De dieren zouden het GGO uit kunnen scheiden. Ook al zou dat gebeuren dan levert dat geen gevaar op omdat de GGO alleen maar stukken DNA met de bijbehorende eigenschappen mist, terwijl de WT bacterie overal in het milieu voor komt. Vaccinatie met deze stam is voor het dier aangetoond veilig en kan niet overleven buiten het dier in het milieu.

G. RISICO MANAGEMENT

- G.1. Welke criteria worden gehanteerd bij de selectie van proefdieren. En wat is het effect van deze criteria op de milieuveiligheid.**
 De dieren worden geselecteerd op algemene gezondheids toestand en leeftijd 1 week tot 16 weken oud.
- G.2. Welke beperking van de omvang van de studie, in relatie tot het aantal proefdieren en de toe te passen dosering wordt toegepast in het kader van risico management maatregelen.**
 Het aantal dieren is voorgeschreven door de overheid en/of is afhankelijk van de te verwachte spreiding in de resultaten i.v.m. statistisch verantwoorde conclusies. Doordat grotere aantallen dieren kunnen worden gevaccineerd (bij conventionele huisvesting), zullen de verschillen eerder significant zijn i.t.t. kleinere proefgroepen in gehuisvest onder inperking.
- G.3. Beschrijf welke maatregelen voorzien zijn ten aanzien van isolatie van het proefdier.**
 Na subcutane enting is de kans dat de dieren vaccinstam uitscheiden zeer klein. Na intranasale toediening is de kans op uitscheiding aanwezig. Isolatie van het proefdier is echter niet nodig omdat het om een deletie mutant gaat waardoor de risico analyse zeer gunstig uit pakt. Desalniettemin zullen de dieren te allen tijde fysisch ingeperkt zijn omdat ze in stallen en/of afgerasterde weilanden gehouden worden (volgens de betreffende farm routines).
- G.4. Beschrijf welke maatregelen worden getroffen om verspreiding van het GGO naar derden (waaronder bij de studie en de proefdieren betrokken personeel) te voorkomen.**
 De kalveren worden verzorgd en behandeld volgens de normale farm routines. Alle kalveren zijn normaal gesproken al drager van wildtype *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*. Na periodes van stress kan deze "low level presence" omslaan in een klinische infectie. Met name na intranasale toediening zal er altijd contact zijn tussen vaccinstam en wildtype stammen.
 Er worden voor deze vaccinatie proeven geen speciale maatregelen getroffen omdat de vaccin stammen niet pathogeen zijn voor mensen of kalveren en omdat de bacterien buiten de gastheer niet kunnen overleven maar vooral ook omdat het om deletie mutanten gaat. Normaal veilig werken en normale farm routines zijn afdoende.
- G.5. Beschrijf welke maatregelen worden getroffen om verspreiding van het GGO naar derden (waaronder bij de studie en de proefdieren betrokken personeel) te voorkomen indien er sprake is van onverwachte gebeurtenissen zoals bijvoorbeeld ook de dood van een proefdier.**
 De veiligheid is zeer uitgebreid getest. De kans op een dood dier t.g.v. de vaccinatie is nihil. Mocht er toch onvoorzien een dier sterven tijdens de proef dan wordt er sectie verricht en worden er monsters genomen om de oorzaak te onderzoeken. Het kadaver kan vervolgens via de normale farm routines afgevoerd worden.



G.6. Beschrijf van welke monsters verwacht kan worden dat zij GGO's kunnen bevatten, en geef voor die monsters aan hoe bemonstering plaatsvindt, en hoe de monsters verder worden verwerkt.

De monsters die genomen worden zijn bloed (serum) voor antilichaam titratie en neus swabs voor isolatie van de challengestam (indien van toepassing).

Alleen na intranasale toediening is de kans aanwezig dat er vaccinstam aan de swab zit. Dit is echter niet erg omdat de vaccin stammen duidelijk geattenuëerd en veilig zijn en omdat ze niet kunnen overleven buiten de gastheer maar vooral ook omdat het deletie mutanten zijn. De monsters worden verwerkt op een daarvoor uitgerust bacteriologisch laboratorium.

H. MONITORING EN AFVALVERWERKING

H.1. Op welke wijze wordt het GGO preparaat gedetecteerd na de toediening.

Ook al zijn er specifieke PCR's beschikbaar, achten wij detectie van de vaccin stam niet nodig omdat dit al zeer uitgebreid getest is. Het is bekend dat na subcutane toediening de vaccine stam tijdelijk op de injectieplaats aanwezig kan blijven. Na intranasale toediening kunnen de vaccinstammen langer aanwezig blijven en zelfs uitgescheiden worden. Monsternamen en detectie zou dit slechts bevestigen.

H.2. Beschrijf hoe de monitoring wordt opgezet om eventuele verspreiding van het GGO waar te kunnen nemen.

Het is bekend dat kalveren na intranasale toediening de vaccin stammen tijdelijk in geringe hoeveelheden uit kunnen scheiden. Via neuscontact zouden andere kalveren in contact kunnen komen met de vaccinstammen. Buiten de gastheer kunnen de vaccinstammen niet lang overleven. Monitoring zou dit nogmaals kunnen bevestigen.

H.3. Geef een overzicht van de aard en hoeveelheid van het geproduceerde afval en beschrijf hoe het afval wordt afgevoerd.

Alleen na intranasale toediening kan er tijdelijk uitscheiding optreden zodat de strooisellaag na hoesten, niesen of speekselen besmet zou kunnen raken. Buiten de gastheer kunnen de vaccinstammen echter niet lang overleven. Daarnaast zijn de vaccinstammen veilig voor mens en dier en zijn het deletie mutanten.

Stro en mest zal daarom volgens de normale farmroutines afgevoerd/verwerkt worden en er zullen geen speciale maatregelen t.b.v. afvoer van afval genomen worden.

H.4. Beschrijf welke maatregelen gehanteerd worden om verspreiding van het genetisch gemodificeerd organisme te voorkomen.

Geen bijzondere maatregelen.

Het betreft "schone" deletie mutanten die geen vreemd DNA in het milieu kan introduceren. De attenuatie en veiligheid voor de gastheer zijn uitgebreid aangetoond. Bij de proeven op de kalverbedrijven worden de normale Farm routines gehanteerd. De dieren zijn te allen tijde fysisch ingeperkt omdat ze in stallen en/of afgerasterde weilanden gehouden worden.