

INGEKOMEN 09 DEC. 2009

RIVM/SEC/Bureau GGO
t.a.v. dr. D.A. Bleijs
Postbus 1
3720 BA BILTHOVEN

7 december 2009

Geachte heer Bleijs,

Naar aanleiding van uw brief van 23.11.2009 betreffende aanvullende gegevens voor aanvraag IM09-004 stuur ik u de volgende informatie:

- 1 In het aanvraagformulier in sectie B3.9 en B3.10 geeft u een korte beschrijving van de constructie van het GGO en de daarbij gebruikte vector. Uit de beschrijving, en informatie uit bijlage II waarnaar verwezen wordt, is echter niet helder op welke wijze het GGO tot stand gekomen is. U dient aan te geven welke genen verwijderd zijn en wat de functie van elk van de afzonderlijke genen is. Daarbij dient u uitvoeriger te beargumenteren waarom er geen DNA afkomstig van de vector achtergebleven is in het GGO. Tevens wordt u verzocht om het mechanisme van verwijdering aan te geven en de test die is uitgevoerd om de afwezigheid van de vector(delen) te verifiëren.***

In ons antwoord op vraag B3.9 en B3.10 zijn wij in gebreken gebleven. Aan het einde van vraag 3.9 verwijzen wij naar Bijlage II en van der Geize 2008. Dit had eigenlijk Bijlage I en II moeten zijn. In Bijlage I (van der Geize 2008) beschrijven de auteurs van het artikel hoe zij de supA en supB (supAB) genen van *Rhodococcus equi* verwijderd hebben. Bovendien beschrijven zij in detail de technologie die zij specifiek ontwikkeld hebben voor het maken van schone deleties in *R. equi*. Deze deletie techniek hebben de auteurs van het artikel ook gebruikt voor het verwijderen van geneAB en geneAB2. In figuur 4 van Bijlage I is een duidelijke schematische beeld gegeven van de essentiële stappen om de supAB-deletie mutant te maken. Wordt in dit schema supAB vervangen door geneAB of geneAB2 dan heeft men een duidelijk beeld van de stappen in de deletie van de geneAB of geneAB2 operons.

Schematisch is er het volgende gebeurd. Met behulp van PCR zijn twee fragmenten gemaakt, van ongeveer 1500 bp lang, die 1) een klein stukje van het begin van het geneA gen met een groot gedeelte van het upstream gen en 2) een klein stukje van het einde van het geneB gen met een groot gedeelte van het downstream gen. Deze twee fragmenten zijn sequentieel in een vector gezet (Bijlage I, figuur 4B; Bijlage II, figuur 1). Daarna is deze vector naar *R. equi* getransformeerd en is er gekweekt in aanwezigheid van apramycine. Omdat de vector, waarop het apramycine resistentie gen ligt, niet kan repliceren in *R. equi* kunnen de bacteriën alleen maar apramycine resistent worden als het plasmide zich integreert in het chromosoom van de bacterie d.m.v. homologe recombinatie (Bijlage I

figuur 4C; Bijlage II, figuur 1). De verkregen apramycine resistente *R. equi* bacteriën zijn daarna getest op 5-fluorocytosine gevoeligheid. De genen die voor deze gevoeligheid zorgen, cytosine deaminase en uracil fosforibosyltransferase, liggen ook op het plasmide en zijn derhalve ook in het chromosoom geïntegreerd. Een apramycine resistente en 5-fluorocytosine gevoelige stam is daarna gekweekt zonder enige vorm van selectie en de cultuur is uitgeplaat op platen die 5-fluorocytosine bevatten.

Alleen die bacteriën die groeien op deze platen hebben de vector backbone eruit gegooid en zijn weer wild type of schone deletie mutant geworden (Bijlage I, figuur 4C). Bacteriën die 5-fluorocytosine ongevoelig waren en ook apramycine gevoelig bleken, zijn vervolgens getest m.b.v. PCR waarin niet alleen de deletie is aangetoond maar ook dat er geen vector materiaal in de mutant *R. equi* was achtergebleven (Bijlage I, figuur 4C en figuur 5; Bijlage II, figuur 1).

Theoretisch kan er in het proces dat geleid heeft tot de constructie van de dubbele deletie mutant (geneAB en geneAB2) geen vector DNA in de *R. equi* bacterie zijn achtergebleven. Homologe recombinatie met counterselectie, en of dat nu met sucrose/sacB combinatie, 5-fluorocytosine /cytosine deaminase en uracil fosforibosyltransferase combinatie of een andere is geweest, levert altijd weer wildtype of schone mutant op. De methode is al duizenden malen uitgevoerd en zelden of nooit werd vector materiaal terug gevonden in de mutant. Ook in dit experiment is aangetoond met behulp van PCR dat er geen vector materiaal is achtergebleven in de deletie mutant. Over de functie van de genen kunnen wij niet veel meer vertellen dan dat zij essentieel zijn voor de groei in macrofagen.

- 2 In sectie F1 van het aanvraagformulier wordt gemeld dat, indien de deletie van het GGO overgenomen wordt door soortgenoten deze eveneens verminderd in staat zijn om macrofagen te overleven. Uit de aangeleverde milieurisicoanalyse wordt echter niet duidelijk wat de kans is op, en het effect is van, het herintroduceren van een subset van de verwijderde genen in het GGO door bijvoorbeeld contact met wildtype *R. equi*. In hoeverre kan het GGO genetisch materiaal opnemen van bijvoorbeeld verwante *R. equi* stammen (o.a. varken) en is het mogelijk dat daarbij chimère stammen ontstaan met veranderde pathogeniteit en/of gastheerbereik? U dient deze punten op basis van literatuurgegevens of onderzoeksdata nader te omschrijven.**

In antwoord F1 gaan wij in op het scenario hoe de vaccinstam in het milieu kan verspreiden en hebben wij alleen aangegeven dat transfer van de deletie naar WildType (WT) *R. equi* stammen niet bijdraagt aan de verspreiding van de modificatie.

Echter om toch in te gaan op de kans op overdracht van de deletie op WT *R. equi* stammen kunnen we het volgende melden. De kans dat de deletie overgaat op een WT *R. equi* stam is uitermate klein en levert dan weer een deletie mutant op. Deze kans is klein omdat de deletie zich niet op een mobiel element (plasmiden, transposon etc.) bevindt, maar op het chromosoom ligt. Zonder de hulp van hulpmiddelen (fagen, transposases etc) is de kans dat een chromosomaal gen overgaat van de ene stam naar de andere stam zeer klein. Verder kan er nog opgemerkt worden dat er blijkbaar geen evolutionair voordeel is voor *R. equi* om de geneAB en geneAB2 te verwijderen. Als dat het wel geval was dan zouden er in de natuur verschillende stammen voorkomen die mutaties zouden hebben die de groei in macrofagen onmogelijk maken, deze zijn echter nog nooit gevonden. Verder omdat de geneAB en geneAB2 genen terug gevonden worden in alle verwante pathogene en niet pathogene bacteriën (*Mycobacteria*, *Norcardia*, *Rhodococci* etc) lijkt het erop dat de genen ook nog een andere functie hebben dan alleen groei in macrofagen. Naar alle waarschijnlijkheid is er selectie om deze genen te handhaven in het genoom.

De GGO zou eventueel genen op kunnen nemen van de reeds aanwezige WT *R. equi* stammen. *R. equi* komt overal voor en dus ook in de darm waar het vaccin zijn werk moet doen, en dan ontstaat er, in het geval dat zowel geneAB en geneAB2 overgaan, een

nieuwe WT stam. Dit levert geen probleem op omdat er al WT *R. equi* aanwezig was. Ook hier geldt weer dat de kans dat dit gebeurt zeer zeer klein is. Dat een chromosomaal operon met 2 genen overgaat is al een unicum maar dat dit een tweede maal gebeurt in 1 event is bijna onmogelijk.

De geneAB en geneAB2 operons spelen geen rol in gastheer specificiteit. De gastheer specificiteit wordt bepaald door het virulentie plasmide. Hier is het, misschien ten overvloede, van belang om nogmaals op te merken dat geneAB en geneAB2 niet op het virulentie plasmide liggen maar op het chromosoom.

De kans dat de vaccinstam door opname van een ander virulentie plasmide zijn gastheer bereik kan uitbreiden is ook zeer klein. Alle *R. equi* stammen die al een virulentie plasmide hebben zijn niet ontvankelijk voor de conjugatie met een andere virulentie plasmide.

Verwante plasmiden zijn incompatibel, m.a.w. slechts een van hen kan repliceren in de bacterie waarbij de "nieuwkomer" meestal het onderspit delft. Mocht dit toch gebeuren dan blijft de stam een mutant die niet kan groeien in macrofagen en dus ook in andere gastheren (o.a. varkens) geen ziekte kan veroorzaken.

- 3 In het aanvraagformulier in sectie B3.13 en C1 gaat u in op de mogelijke verspreidingsroutes en overlevingskansen van het GGO. U dient op basis van literatuurgegevens of onderzoeksdata nader te omschrijven in hoeverre het GGO minder goed kan overleven dan het wildtype micro-organisme. Hierbij dient u ook in te gaan op de aanwezigheid van het GGO in de gastheer en overige niches (bijvoorbeeld mest, bodem).**

Omdat de vaccinstam verminderd in staat is in macrofagen te overleven kan hij ook minder goed in de gastheer overleven. Dit heeft tot gevolg dat de vaccin stam zelfs geheel veilig is voor de gastheer en geen ziekte meer veroorzaakt. Dit in tegenstelling tot de uitgangsstam (zie bijlage III, IV en V van de aanvraag).

Volgens verwachting is de vaccinstam buiten de gastheer niet of nauwelijks geattenuëerd (omdat daar geen macrofagen voorkomen). Voorjaar 2009 is een proef gestart om de overleving van de vaccinstam in drinkwater, in vijverwater en grond te vergelijken met de uitgangsstam. Duplo's van de betreffende testsystemen werden gespiket met de vaccinstam of met de uitgangsstam en vervolgens weggezet bij 4°C, 20°C en 37°C. De proef loopt nog steeds maar na 20 weken is er (nog) geen verschil in afname tussen beide stammen. Beide bacteriën zijn nog volop aanwezig in de monsters bij alle temperaturen. Dus buiten de gastheer (mest/bodem) lijkt de vaccinstam volgens verwachting niet geattenuëerd en zowel de vaccinstam als de uitgangsstam kunnen lang in het milieu overleven. Maar de vaccin stam overleeft in ieder geval niet beter dan de uitgangsstam.

- 4 In sectie E5 van het aanvraagformulier wordt aangegeven dat dieren gedurende de proef niet in aanraking komen met dieren die geen deel uitmaken van de studie. U wordt verzocht om nader te specificeren wanneer het experiment is afgelopen en wat hiervoor de criteria zijn. Tevens dient u te beschrijven wat er met de dieren gebeurt, bijvoorbeeld verhandelen (zie ook sectie A.34), nadat de proef is afgelopen. Is het daarbij ook mogelijk dat tijdens het experiment de dieren verhandeld worden en het GGO nog uitscheiden? Indien dit het geval is moet u dit nader omschrijven.**

Het doel van de proeven is om het optimale vaccinatie schema te vinden en vervolgens proeven te doen om data voor product registratie te verkrijgen. Een proef is afgelopen als die gegevens gegenereerd zijn. Bijv een efficacy proef is afgelopen nadat we hebben vastgesteld dat de dieren beschermd waren na challenge of nadat vastgesteld is dat de dieren een beschermende titer hebben. Een nauwkeurig tijdsframe is moeilijk te geven omdat het afhangt van de soort studie.

In eerste instantie (naar schatting de eerste twee jaar) zouden we graag proeven willen uitvoeren op conventionele bedrijven van Intervet. De dieren voor deze proeven zullen worden aangekocht en zijn ons eigendom. Tijdens deze fase is het dus mogelijk om de dieren te screenen op uitscheiding en indien ze op het einde van de proef nog uitscheiden, kunnen we ze langer in de proef houden en/of euthanaseren.

Daarna, afhankelijk van hoe de eerste fase loopt (naar schatting het tweede en/of derde jaar) willen we bij particuliere stoeterijen proeven gaan doen. Hier zullen we de farmroutines volgen en kunnen we het verhandelen van paarden op het einde van de proef niet tegenhouden. Als er persistente uitscheiders zijn kunnen we niet verlangen dat het betreffende dier afgemaakt moet worden. Het is theoretisch mogelijk om dieren die *R. equi* uitscheiden oraal antibioticum toe te dienen om de *R. equi* te verwijderen.

Wij zijn echter van mening dat het screenen van faeces monsters geen toegevoegde waarde heeft omdat al bekend is dat dieren via de faeces uitscheiden en dat de bacterie zeer lang in het milieu kan overleven.

De introductie in het milieu heeft een zeer laag risico profiel: de vaccinstam is bewezen geattenuerd en veilig voor veulens. Veiligheid is inmiddels eveneens aangetoond in andere dieren waarmee de bacterie via faeces van de veulens in contact kan komen: muizen, ratten en kippen. Daarom zijn wij van mening dat extra monsternames en criteria om de paarden al dan niet in leven te laten na beëindiging van de proef geen toegevoegde waarde hebben en niet relevant zijn. Wat relevant is is dat de vaccin stam eigenschappen mist; het is een deletie mutant, wat zeer gunstig uitpakt voor de risico analyse.

- 5 In sectie G6 van het aanvraagformulier geeft u aan dat de monsters getest worden in het microbiologische laboratorium van Intervet. U dient aan te geven of deze handelingen onder de huidige introductie in het milieu aanvraag vallen of onder een ingeperkt gebruik vergunning. Indien het laatste het geval is moet u het betreffende IG nummer vermelden.**

Tot nu toe zijn alle werkzaamheden uitgevoerd zoals onder IG 99-123.

Het Microbiologisch Laboratorium van Intervet is een ML-II laboratorium waar standaard routines gevolgd worden. Dus ook in de toekomst zullen de monsters volgens ML-II normen behandeld en verwerkt worden ongeacht de uitkomst van deze aanvraag.

- 6 In de bijlagen van het aanvraagformulier worden diverse resultaten van experimenten beschreven. Is het correct dat deze resultaten verkregen zijn uit de werkzaamheden zoals die onder vergunning IG 99-123 zijn uitgevoerd? Zo niet, dan wordt u verzocht om de voor de milieurisicoanalyse relevante onderzoeksresultaten uitgevoerd onder de eerder genoemde vergunning aan te leveren.**

De resultaten zoals genoemd in de bijlagen van de aanvraag, zijn verkregen uit werkzaamheden uitgevoerd onder vergunning IG 99-123.

- 7 In het aanvraagformulier in sectie A.34 wordt gemeld dat de proeven worden uitgevoerd op conventionele dierverblijven van Intervet (binnen of buiten Boxmeer) en nog te selecteren particuliere stoeterijen in Nederland. Uit de aangeleverde informatie is niet af te leiden op welke manier en door welke personen (particulieren of dierenartsen al dan niet in dienst van Intervet) het vaccin op stoeterijen aan de paarden zal worden toegediend. Particulieren en stoeterijen hebben geen dienst- of ander verband met Intervet en vallen juridisch gezien derhalve niet onder de zeggenschap van de vergunninghouder (zie toelichting bij sectie vergunningaanvrager A8 op bladzijde 3 van de aanvraag).**

De vergunninghouder moet de naleving van vergunningsvoorschriften bij de uitvoering van de werkzaamheden kunnen afdwingen. Hiervoor is het noodzakelijk dat de bij de studie betrokken medewerkers vallen onder de zeggenschap van de

vergunninghouder. Uit de aangeleverde informatie in het aanvraagformulier kan niet worden opgemaakt dat aan deze zeggenschap voldaan wordt. U wordt verzocht aan te geven op welke wijze u zeggenschap behoudt over de handelingen met het GGO bij particulieren en stoeterijen.

Zoals aangegeven in antwoord 4 zullen de eerste twee jaar proeven gedaan worden op conventionele bedrijven van Intervet met dieren die eigendom zijn van Intervet. De toediening en monsternamen zal dan uitsluitend door getraind personeel van Intervet gedaan worden. Daarna (tweede/derde jaar) willen we naar particuliere stoeterijen en hier wordt de toediening eveneens uitsluitend door Intervet personeel gedaan. De paarden zijn geen eigendom van Intervet, dus incidentele monsternamen en veterinaire handelingen door derden zijn mogelijk.

8 In sectie A.34 wordt aangegeven dat de locaties van Intervet en de particuliere stoeterijen in Nederland nog geselecteerd moeten worden. U dient aan te geven of deze locaties al geselecteerd en bekend zijn. Indien dit niet het geval is moet u aangeven en beschrijven op welke wijze de adresgegevens beschikbaar worden gesteld.

Zoals aangegeven in antwoord 4 zullen de eerste twee jaar proeven gedaan worden op conventionele bedrijven van Intervet. Daarna willen we naar particuliere stoeterijen die nog geselecteerd moeten worden. De adresgegevens van de locaties zullen schriftelijk worden doorgegeven zo gauw deze bekend zijn (dus ruim voor de start van de proef op die betreffende locatie).

Ervan uitgaande u hiermee van voldoende informatie te hebben voorzien.

Met vriendelijke groet,


Dr. ir. Ellen Joosten (MVF)
Intervet / Schering-Plough Animal Health

cc. dr R. Segers (VM-II), dr P. Vermeij (VM-I), dhr. J. van Raaij (directie)

* KOPIE *