

INGEKOMEN 29 JAN. 2010

RIVM/SEC/Bureau GGO  
Postbus 1  
3720 BA BILTHOVEN

Boxmeer, 26 januari 2010

Beste mevrouw Van Esschoten,

In antwoord op uw verzoek om aanvullende informatie bij aanvraag IM09-004/00 van 11 januari j.l. deel ik u het volgende mede:

- De gedeleteerde genen zijn omschreven als zijnde essentieel voor de groei van macrofagen, maar daarnaast lijkt het erop dat ze ook nog een andere functie hebben. U wordt verzocht uitgebreid op deze (potentiële) functies in te gaan. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat een deel van de deleties opgeheven wordt en een mutant ontstaat met functies die kunnen verschillen van het ggo als wel van het wildtype. U wordt verzocht een redenering te schrijven die ingaat op de karakteristieken van de mutant(en).***

De genen beschreven in de aanvraag heten ipdAB en ipbAB2. De ipdAB genen liggen in de regio van het genome van *R. equi* dat codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij de afbraak van cholesterol en andere steroïden. Dit gebied van het genome omvat meer dan 65 genen. Op basis van deze observatie zou men kunnen verwachten dat de genen betrokken zijn bij een omzetting van een van de intermediären in de afbraak van steroïden. Proeven met intermediären uit de cholesterol afbraak lieten zien dat ipdAB en/of ipdAB2 betrokken zijn bij de omzetting van methylhexahydroindanedione propionate en 5-hydroxy- methylhexahydroindanonone propionate. Dit betekent dat ipdAB en ipdAB2 coderen voor CoA-transferases. De koppeling tussen voorspelde functie en geobserveerde functie is niet eenduidig. Het inactiveren van genen die betrokken zijn bij de opname van steroïden in de cel, en aantoonbaar de groei op steroïden onmogelijk maakt, heeft geen invloed op de overleving van de bacteriën in macrofagen. Dus de steroïde afbraak op zich zelf is niet van belang bij de overleving in macrofagen.

De mogelijkheid dat een deel van het gedeleteerde operons worden hersteld zal niet leiden tot het ontstaan van een bacterie met een functie die verschilt van het GGO of wildtype. Uit de literatuur is bekend dat in 5-hydroxy- methylhexahydroindanonone propionate degradatie, de activering van het molecuul met CoA een vereiste is alvorens de noodzakelijke reductie (ringopening) kan plaatsvinden. Microbiële CoA-transferases bestaan meestal uit twee paren van een  $\alpha$  en  $\beta$  subunits, in de vorm van een  $\alpha\beta$  enzym complex. Losse  $\alpha$ - of  $\beta$  subunits hebben geen enzymatische activiteit.

Ook al zou een deletie functioneel helemaal hersteld worden in aanwezigheid van wildtype dan kan de mutant hooguit terugmuteren naar wildtype. In dat geval ontstaat weer het wildtype welke al reeds aanwezig was.

2. ***Het ggo wordt oraal of rectaal als vaccin aan de proefdieren toegediend, waar het ggo zich in de darmen vermenigvuldigt en wordt uitgescheiden via feces. Een veulen of paard dat niet deel neemt aan de proef zal met het ggo in contact komen via de orale route en/of via de luchtwegen. Het scenario dat optreedt wanneer het ggo via de orale route verspreid is uitgebreid beschreven, echter wat er gebeurt als het ggo via de luchtwegen binnenkomt niet. U wordt verzocht ook dit scenario te beschrijven.***

Als het vaccin oraal of rectaal aan de proefdieren wordt toegediend dan kan het vaccin zich vermenigvuldigen in de darm van het proefdier. Het proefdier komt niet in contact met veulens die niet deelnemen aan de proef. Mocht er onder zeer uitzonderlijke omstandigheden toch een veulen dat niet aan de proef deelneemt in contact komen met het vaccin en het vaccin inademt, dan is er nog steeds geen enkel risico. Tijdens eerdere proeven is het vaccin intratracheaal toegediend aan veulens (zie addendum III). Gedurende deze proeven bleek dat de geattenueerde bacterie zich niet kan handhaven in de longen en werd opgeruimd, en daarom volkomen veilig is. Met andere woorden een luchtweg infectie is een doodlopende weg voor het vaccin, hij wordt daar door het dier geëlimineerd. Er zal via die route dus ook geen verdere uitscheiding of spreiding optreden.

3. ***De kans op verspreiding van het ggo naar derden hangt samen met de overleving van het ggo in het milieu. Hoe lang overleeft het wildtype normaliter in het Nederlandse milieu (buiten zijn gastheer) ? Er wordt aangenomen dat het ggo niet langer zal overleven dan het wildtype, u wordt verzocht deze aanname te onderbouwen.***

Het GGO is geattenuerd in dieren omdat het niet meer kan overleven in macrofagen. Omdat er buiten het dier geen macrofagen zijn verwachten wij daar ook geen verschil in overleving met het wildtype. Er loopt momenteel een proef (al 6 maanden) waarin overleven van wildtype in vergelijking met de GGO in verschillende milieus (kraanwater, vijverwater en grond) en bij verschillende temperaturen (4°, 20°C en 37°C getest wordt. Na 6 maanden is de hoeveelheid geïsoleerde bacteriën wel wat verminderd maar uit alle drie de milieus en bij alle drie de temperaturen kunnen we nog steeds R. equi terugkweken. Hierbij zien we (volgens verwachting) geen verschillen tussen wildtype en GGO. Buiten het dier overleeft het GGO niet beter maar ook niet slechter dan het wildtype. Alleen in het dier overleeft hij slechter vanwege een slechte macrofaag overleving. Er is geen reden om, op basis van de aangebrachte deletie, aan te nemen dat het GGO toegenomen kansen heeft om zich in het milieu te handhaven t.o.v. het wildtype.

4. ***De proefdieren worden volgens reguliere "farm routines" gehouden en behandeld. Wat gebeurt er met de met het ggo gevaccineerde proefdieren aan het eind van de proef (m.a.w. worden deze aangeboden voor destructie of bijvoorbeeld voor (dier)consumptie ? wat zijn de reguliere "farm routines" voor al het afval dat in potentie levend ggo bevat ?***

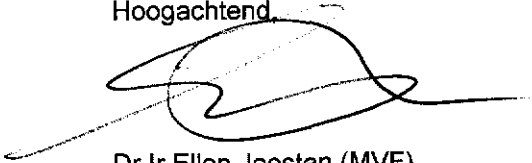
De bedoeling van deze veldproeven is dat een vaccin op de markt komt dat dieren beschermt tegen Rhodococcus infectie. Het vaccin zal dan onder normale omstandigheden aan paarden in paardenhouderij worden toegediend. De dieren ondervinden dus geen nadelige gevolgen van de vaccinatie, en zullen geen speciale routines volgen.

De dieren worden daarom ook tijdens de proef gehouden onder normale omstandigheden in een normale houderij, zonder speciale inperking (behalve dubbele afrastering). Er hoeven geen speciale maatregelen genomen te worden, omdat het GGO een deletiemutant is. Er zal dus geen vreemd DNA in het milieu worden gebracht. Het GGO kan als vaccin aan deze dieren worden toegediend, omdat er geen risico's verbonden zijn aan het vrijkomen van deze vaccinstam in het

\* KOPIE \*

milieu (zie antwoorden vraag 2 & 3). Dit geldt ook voor afval (mest). De dieren zouden na deze proeven in leven kunnen blijven en kunnen worden geplaatst in elke reguliere paarden houderij.

Hoogachtend,



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

Cc Dhr. J. van Raaij (directie), Dr. P. Vermeij