

Milieurisicoanalyse bij de aanvraag IM 10-004

Datum: 09-06-2011

De milieurisicoanalyse is onder verantwoordelijkheid van het Ministerie van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer uitgevoerd overeenkomstig bijlage II van de Richtlijn 2001/18/EG inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en het richtsnoer 2002/623/EG ter aanvulling van deze bijlage II. Daarbij is rekening gehouden met de uitwerking op het milieu van de geïntroduceerde organismen en het milieu waarin wordt geïntroduceerd.

De milieurisicobeoordeling neemt zowel directe als indirecte, de onmiddellijk en de vertraagd optredende risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu in beschouwing, die de doelbewuste introductie met zich mee kan brengen. Bij de milieurisicobeoordeling moeten de potentiële schadelijke effecten van geïdentificeerde kenmerken van het GGO worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme waaruit het GGO is afgeleid. Daarbij worden de omstandigheden van het voorgenomen gebruik in aanmerking genomen. De beoordeling moet per geval worden uitgevoerd, wat betekent dat de vereiste informatie kan verschillen afhankelijk van het betrokken GGO en het voorgenomen gebruik daarvan.

Opgemerkt moet worden dat voor studies met mensen niet primair het risico voor de patiënt wordt getoetst. Deze toets wordt sinds het in werking treden van de Wet medisch wetenschappelijk onderzoek met mensen beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). Voor studies met dieren geldt dat het welzijn van de dieren en de hiermee verband houdende ethische overwegingen getoetst wordt door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD).

De milieurisicoanalyse van de aangevraagde werkzaamheden bestaat uit de volgende delen.

Deel 1 bevat een samenvatting van de gegevens zoals die zijn aangeleverd door de aanvrager. Deze gegevens dienen als basis van de milieurisicoanalyse van het dossier zoals deze volgt uit de kenmerken van de GGO's en de voorgestelde wijze van introductie.

Deel 2 geeft de milieurisicoanalyse voor de introductie in het milieu van het GGO. Hierbij wordt per sequentie bepaald hoe de nieuwe kenmerken van het GGO eventueel schadelijke effecten kunnen hebben voor het milieu.

De milieurisicobeoordeling wordt uitgevoerd conform de Europese Richtlijn 2001/18/EG, volgens de methodologie beschreven in bijlage II van deze Richtlijn. De Richtlijn geeft een overzicht van de kenmerken die beoordeeld moeten worden om de schadelijke gevolgen voor het milieu in kaart te brengen.

De Richtlijn is algemeen gericht op de introductie in het milieu, en niet specifiek bedoeld voor klinisch onderzoek met GGO's bij mens of dier. De Richtlijn bevat daardoor beoordelingskenmerken die voor een GGO voor klinische toepassing niet of minder relevant zijn.

Voordat invulling wordt gegeven aan de milieurisicobeoordeling van een GGO dat toegepast wordt in een klinische studie bij mens of dier wordt een overzicht gegeven van kenmerken uit bijlage II van de Richtlijn die hiervoor relevant worden geacht.

In onderdeel C2 van bijlage II van de Richtlijn wordt een aantal mogelijke schadelijke effecten opgesomd.

Hieronder wordt een kort overzicht gegeven van de in de Richtlijn genoemde aspecten. Hierbij wordt in algemene bewoordingen beschreven of het genoemde kenmerk al dan niet van belang is bij de beoordeling van de werkzaamheden.

In dit document volgt een nadere toelichting op de beoordelingsaspecten waarbij de Richtlijn en de bijbehorende toelichting fungeren als startpunt.

I. Ziekten bij de mens, met inbegrip van allergische en toxische effecten.

Het is van belang na te gaan in hoeverre de toepassing van het GGO kan leiden tot het ontstaan van ziekten. Hierbij moeten de ziekteverwekkende eigenschappen van het GGO worden vergeleken met die van het uitgangsgenoom. Van de meeste ziekteverwekkende organismen is de pathogeniteit bekend. De pathogeniteit van het uitgangsgenoom is een belangrijk uitgangspunt. Omdat de ziekteverwekkende eigenschappen van een GGO niet enkel worden bepaald door de pathogeniteit van het uitgangsgenoom worden ook de genetische modificatie en de toepassing in beschouwing genomen. In de Richtlijn worden diverse beoordelingsaspecten genoemd welke de ziekteverwekkende eigenschappen van een GGO kunnen beïnvloeden. Deze beoordelingsaspecten worden later in deze notitie nader toegelicht.

II. Ziekten bij dieren en planten, met inbegrip van allergische en toxische effecten.

Omdat in klinische studies toegepaste GGO's veelal zijn afgeleid van uitgangsgenomen die niet in staat zijn een plantaardige gastheer te infecteren wordt verondersteld dat deze GGO's bij planten geen ziekten kunnen veroorzaken. Mochten er in een voorkomend geval toch overwegingen zijn bij de combinatie gastheer/gekloneerde genen die betrekking hebben op de plantpathogeniteit, dan worden deze alsnog in beschouwing genomen.

Voor ziekten bij dieren geldt een overeenkomstige argumentatie als verwoord onder het kopje ziekten bij de mens. In de notitie worden ziekten bij de mens en ziekten bij dieren gezamenlijk behandeld.

III. Effecten op de populatiedynamiek van soorten binnen het milieu en effecten op de genetische diversiteit van elk van die populaties.

Effecten op patiënten of proefdieren welke optreden ten gevolge van de toediening van een GGO behoren niet tot het wettelijke kader waarbinnen de milieurisicobeoordeling wordt uitgevoerd. Effecten op patiënten of proefdieren vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend (dieren)arts en worden in het geval van klinische studies bij mensen beoordeeld door de CCMO. Echter, effecten op mens en dier in de omgeving van patiënt of proefdier (niet doelpopulaties) kunnen afgeleid worden uit de effecten die mogelijk kunnen optreden bij de patiënt / proefdier. Daarom worden effecten op de doelpopulatie in de overwegingen betrokken waarbij in vervolgens nagegaan moet worden in hoeverre derden met het GGO in contact komen en als dit het geval is wat de kans is dat effecten optreden.

IV. Gewijzigde gevoeligheid voor ziekteverwekkers, waardoor de verspreiding van besmettelijke ziekten wordt vergemakkelijkt en/of nieuwe reservoirs of vectoren worden gecreëerd.

Gevoeligheid voor ziekteverwekkers is van groot belang bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde planten en andere hogere organismen. De gevoeligheid voor ziekteverwekkers van micro-organismen is niet van toepassing bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde virussen, virale vectoren en bacteriën.

V. Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische en veterinaire behandelingen.

Als voorbeeld noemt de Richtlijn hierbij het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische, veterinaire of plantenbeschermingsbehandelingen, door het ontstaan van antibioticumresistentie door genoverdracht. Ten aanzien van de genoemde plantbeschermingsbehandelingen gelden dezelfde overwegingen als die werden genoemd in het kader van ziekten bij planten, in paragraaf II. Om deze reden worden effecten op plantenbeschermingsbehandelingen niet in de milieurisicobeoordeling opgenomen. Het in gevaar brengen van medische en veterinaire behandelingen wordt later uitgewerkt voor specifieke aspecten behorend bij de betreffende studie.

VI. Effecten op biogeochemische cycli.

Met betrekking tot de effecten op biogeochemische cycli moet met name ingegaan worden op recycling van koolstof en stikstof uit organisch materiaal in de bodem. Van een GGO dat in een klinische studie bij mens of dier wordt toegepast kan over het algemeen uitgesloten worden dat zij gedurende langere tijd buiten een gastheer overleven in het milieu. Alleen indien overleving gedurende langere tijd mogelijk is en er een interactie kan plaatsvinden met organismen in de bodem die een rol spelen in deze processen zou dit aspect in de beoordeling van belang moeten zijn. Organismen die toegepast worden in klinische studies die langere tijd overleven buiten een gastheer en een interactie hebben met organismen in de bodem zijn niet eerder toegepast in klinische studies. Bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu van GGO's zal dit beoordelingsaspect over het algemeen niet uitgewerkt worden.

In de bovenstaande onderdelen A tot en met F wordt een overzicht gegeven van de beoordelingsaspecten zoals deze uit Richtlijn 2001/18/EG zijn afgeleid. Niet alle beschreven onderdelen zijn van belang bij de beoordeling van klinische studies met mensen of dieren.

De relevante onderdelen worden hieronder nader uitgewerkt en vertaald naar de beoordelingspraktijk van klinisch onderzoek. Hiertoe zijn sommige onderdelen samengevoegd en wordt toegelicht welke nadere invulling bij de beoordeling aan deze onderdelen gegeven wordt.

Ziekten bij mens en dier

(toelichting op onderdeel I, II en IV)

De onderstaande uitwerking gaat in op de aspecten die van belang zijn voor de beoordeling van de mogelijke schadelijke effecten van een GGO op mens en milieu, waarbij de nadruk ligt op ziekten bij mens en dier. Uitgangspunt is dat ziekten bij patiënt of proefdier die ten gevolge van toepassing van het GGO kunnen ontstaan in beginsel geen deel uit maken van de beoordeling. Bij de beoordeling wordt wel ingegaan op schadelijke effecten die op kunnen treden bij de patiënt of het proefdier (de 'doelpopulatie'), maar dan alleen omdat de effecten die in de doelpopulatie worden waargenomen indicatief zijn voor effecten die buiten de doelpopulatie kunnen optreden als verspreiding van het GGO in het milieu plaatsvindt. Het is niet vanzelfsprekend dat effecten op de doelpopulatie ook in het milieu kunnen optreden. In dit kader zijn verspreiding in het milieu en blootstelling van derden van belang. Als verspreiding in het milieu en dus blootstelling niet kan plaatsvinden is het zeer onwaarschijnlijk dat de toepassing een gezondheidsrisico vormt voor mens en milieu. In zo'n situatie worden de ziekteverwekkende eigenschappen die eventueel waargenomen worden in de studiepopulatie minder zwaarwegend. Als verspreiding in het milieu en blootstelling kan plaatsvinden dan moet beoordeeld worden welke effecten ten gevolge hiervan kunnen optreden. In zo'n situatie is een effect op de studiepopulatie indicatief.

In het geval dat verspreiding in het milieu en blootstelling niet uitgesloten kan worden, worden verschillende aan de levenscyclus van het GGO verbonden kenmerken in beschouwing genomen. Het betreft de volgende kenmerken: pathogeniteit en virulentie, infectiviteit, gastheerbereik en tropisme, replicatie en transmissie en toxigeniteit en allergeniteit.

Pathogeniteit en virulentie (onderdeel A in Tabel 2)

Pathogeniteit van de uitgangsgenorganismen vormt een uitgangspunt voor de beoordeling van het pathogene potentieel van een GGO. Pathogenese omvat de mechanismen waarmee organismen zoals bijvoorbeeld virussen of bacteriën bepaalde celpopulaties in een specifieke gastheer en een bepaald weefsel kunnen beschadigen waardoor ziekteverschijnselen in deze gastheer kunnen ontstaan. Het vermogen van een pathogeen organisme om een ziekte te veroorzaken in een gastheer noemt men virulentie. Pathogenese en virulentie zijn twee nauw samenhangende begrippen die bij een beoordeling uitgesplitst worden in verschillende factoren die pathogeniteit en virulentie beïnvloeden. In principe kan alle nieuwe genetische informatie een effect hebben op de pathogeniteit en de virulentie. Om deze reden wordt van een GGO elke toegevoegde dan wel gedeleteerde sequentie bij de beoordeling betrokken.

Infectiviteit (onderdeel A in Tabel 2)

Infectiviteit neemt in de milieurisicobeoordeling van een GGO een belangrijke plaats in. Bij de beoordeling van de mogelijke schadelijke effecten die op kunnen treden in het milieu wordt eerst beoordeeld in hoeverre het GGO eigenschappen bezit die mogelijk een effect hebben in een geïnfecteerde gastheer. Als deze effecten niet geïdentificeerd kunnen worden is de beoordeling van de infectiviteit minder van belang. Als schadelijke effecten op kunnen treden in de patiënt of het proefdier en verspreiding van het GGO in het milieu kan niet uitgesloten worden, dan is beoordeling van de infectiviteit van belang.

Gastheerbereik en tropisme (onderdeel A in Tabel 2)

Wanneer een donorsequentie wordt ingebracht, kan een eiwit tot expressie komen dat een effect heeft op het tropisme en het gastheerbereik van het GGO in vergelijking met gastheerbereik en tropisme van het uitgangsgenorganisme. Dit kan tot gevolg hebben dat het tropisme en het gastheerbereik van het uitgangsgenorganisme veranderen. In gevallen dat een dergelijk scenario niet uitgesloten kan worden, dan moet in de risicobeoordeling rekening gehouden worden met een additioneel risico. Vervolgens moet nagegaan worden of een eiwit dat tot expressie komt ook daadwerkelijk functioneel is in de (virale) vector. Indien niet uitgesloten kan worden dat er een verandering optreedt in het gastheerbereik en tropisme van de vector, zal dit niet automatisch betekenen dat er ook sprake is van een gewijzigde pathogeniteit. Wel moet het risico in beschouwing genomen worden dat mogelijk andere cellen, weefsels, organen of zelfs gastheren geïnfecteerd kunnen worden en hierdoor schadelijke effecten ondervinden die normaal gesproken niet mogelijk zou zijn geweest zonder de toepassing van genetische modificatie.

Replicatie en transmissie (onderdeel A in Tabel 2)

Onder replicatie en transmissie verstaat men respectievelijk vermeerdering en verspreiding. Bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu moet nagegaan worden of het GGO dat aan patiënt of proefdier wordt toegediend kan repliceren. In eerste instantie moet beoordeeld worden of de vector autonoom kan repliceren. De meeste vectoren die worden toegepast in klinische studies zijn replicatie deficiënt. Replicatie deficiëntie berust veelal op de afwezigheid van een essentieel genproduct waarvan de sequentie in de vector ontbreekt of niet

(functioneel) tot expressie komt. Nagegaan moet worden of de replicatie deficiëntie kan worden hersteld bijvoorbeeld door homologe recombinatie met in de patiënt aanwezige organismen. Als replicatie kan optreden moet nagegaan worden of de vector zich kan verspreiden. In dit kader zijn gegevens over biodistributie van belang. Tot slot moet beoordeeld worden via welke transmissieroutes verspreiding in het milieu kan plaatsvinden en in welke mate dit kan plaatsvinden. Verspreiding in het milieu is een noodzakelijke stap op weg naar blootstelling van derden en het milieu. Als schadelijke effecten op kunnen treden in de patiënt of het proefdier en verspreiding van het GGO in het milieu kan niet uitgesloten worden, dan is beoordeling van de replicatie en transmissie van belang.

Toxigeniteit en allergeniteit (onderdeel D in Tabel 2)

Indien verspreiding van het GGO in het milieu kan optreden is het van belang te evalueren welke schadelijke effecten kunnen optreden. Hierbij moet nagegaan worden in hoeverre het GGO schadelijke sequenties bezit en tot expressie kan brengen. Belangrijke ijkpunten hierbij zijn toxiciteit en allergeniteit van het genproduct.

Genoverdracht naar andere organismen (onderdeel C in Tabel 2)

Erfelijke informatie van een GGO kan overgedragen worden op andere in het milieu aanwezige organismen die direct of indirect in contact komen met het GGO. Bij de beoordeling wordt nagegaan in hoeverre erfelijke informatie van het GGO overgedragen kan worden op andere micro-organismen (bijvoorbeeld een aan de vector verwant organisme). Zo'n proces kan plaatsvinden middels homologe recombinatie. Daarnaast moet beoordeeld worden in hoeverre erfelijke informatie van het GGO via de kiembaan overgedragen kan worden op het nageslacht. Overdracht van erfelijke informatie op zichzelf hoeft niet altijd te leiden tot een gevaar voor mens en milieu. Als overdracht kan optreden maar er geen negatieve effecten geïdentificeerd kunnen worden is er geen sprake van een milieurisico.

De overheid heeft besloten dat overdracht via de kiembaan op het nageslacht in alle gevallen voorkomen moet worden, onafhankelijk van de vraag of er daarbij schadelijke effecten kunnen optreden.

Veranderingen van populatiedynamiek in natuurlijke milieu's (toelichting op onderdeel III)

Genetisch gemodificeerde organismen die in klinische studies toegepast worden kunnen ook een effect hebben op het voorkomen van andere (hogere) organismen en zodoende een effect hebben op de populatiedynamiek. Een illustratief voorbeeld betreft een doelbewuste introductie in het milieu van een virulent myxomavirus in de gevoelige populatie van Europese konijnen in Australië. Aanvankelijk waren de gevolgen desastreus voor de konijnenpopulatie. Maar uiteindelijk ontstonden er virusvarianten met een verminderde virulentie maar ook konijnen met een verhoogde resistentie tegen het virus. Dit voorbeeld illustreert dat een verandering van in de natuur aanwezige micro-organismen ook een effect kan hebben op de gastheer (konijn). Ook een veranderde eigenschap van het gastheerorganisme ten gevolge van genetische modificatie zou een dergelijk effect kunnen veroorzaken. Deze aspecten worden indien het voor de specifieke beoordeling relevant is ingegaan in onderdeel G van Tabel 2.

Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische behandelmethoden (toelichting op onderdeel V)

Veranderde eigenschappen van een organisme ten gevolge van genetische modificatie kan mogelijk tot gevolg hebben dat dit organisme ziekte kan veroorzaken. Als hierdoor de op dat moment geldende medische praktijk direct of indirect niet meer toegepast kan worden voor behandeling van deze ziekten, of wanneer preventieve behandeling niet meer werkt is er sprake van een negatief effect voor het milieu. Daarom moet, als vastgesteld wordt dat een GGO mogelijk ziekteverwekkende eigenschappen bezit, in beschouwing genomen worden welke therapeutische behandelmethoden beschikbaar zijn om de ziekte te bestrijden of te voorkomen. Indien de genetische modificatie de therapeutische behandeling van de ziekte bemoeilijkt of zelfs in gevaar brengt, moet dit in de risicobeoordeling meegewogen worden.

Er kan tijdens de beoordeling ook vastgesteld worden dat het ontstaan van ziekte onwaarschijnlijk is, in dat geval kan mogelijk afgezien worden van een beoordeling van de mogelijke effecten op preventieve en therapeutische behandelmethoden. Op deze aspecten wordt ingegaan in onderdeel H van Tabel 2.

In de Richtlijn 2001/18/EG wordt, na de vaststelling van de beoordelingsaspecten, een methodologie voor de risicoanalyse ontwikkeld. Deze methodologie wordt gevolgd in de tabellen in deel 2. De mogelijk schadelijke effecten die samen kunnen hangen met de nieuw ingebrachte sequenties worden toegelicht. Daarbij worden de verschillende stappen in de "oorzaak-gevolg" relaties tussen de genetische modificatie en het eventuele schadelijke effect verduidelijkt. Zo wordt bepaald welke effecten eventueel toe te schrijven zijn aan de genetische modificatie.

Vervolgens volgt de evaluatie van de eventuele omvang en de waarschijnlijkheid van de schadelijke gevolgen. Redenen voor het niet verder in de milieurisicoanalyse beschouwen van mogelijke schadelijke effecten worden verduidelijkt.

In **Deel 3** vindt tenslotte de bepaling van het algehele risico van het GGO plaats. Deze bepaling wordt gedaan op basis van de risico's die in Deel 2 zijn geïdentificeerd, waarbij rekening wordt gehouden met de mogelijkheid dat er stapeling van risico's plaatsvindt, in het bijzonder als de risico's niet onafhankelijk van elkaar zijn.

Milieurisicoanalyse behorend bij aanvraag IM 10-004

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

DEEL 1. KENMERKEN VAN DE IN DEZE AANVRAAG GEBRUIKTE GGO'S EN HUN INTRODUCTIE

Samenvatting van de gegevens zoals die zijn aangeleverd door de aanvrager. Deze gegevens dienen als basis voor de milieurisicoanalyse van de aangevraagde werkzaamheden en bestaan uit de relevante technische en wetenschappelijke details van de GGO's en de voorgestelde wijze van introductie. Hierbij wordt rekening gehouden de informatievereisten zoals genoemd in bijlage III en in het bijzonder bijlage IIIA van Richtlijn 2001/18/EC. De vindplaats van de informatie in het dossier is tussen haakjes aangegeven. Informatie van bureau GGO is met een asterisk (*) aangegeven.

A. Het ouderorganisme

1. *Pasteurella multocida* is een bacterie die wereldwijd voorkomt in het respiratoire systeem en het spijsverteringskanaal in verscheidene dieren (B.3.3, B.3.5, B.3.6, aanvullende info 17-03-2011)
2. Er zijn verschillende serotypen van *P. multocida* bekend met elk hun specifieke gastheer, zoals katten, vogels en varkens. Transmissie van de bacterie naar andere gastheersoorten komt niet veel voor maar is niet uit te sluiten (B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)
3. *P. multocida* serotype A heeft herkauwers, waaronder runderen en schapen als gastheer (B.3.3, aanvullende info 17-03-2011)
4. Humane isolaten van *P. multocida* tonen aan dat de meeste humane infecties gerelateerd zijn aan bijt- en krabwonden door geïnfecteerde katten en honden waardoor de bacterie direct in de bloedbaan terecht komt (B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)
5. *P. multocida* serotype A is een veelvoorkomende infectie in herkauwers met respiratoire aandoeningen (B.3.3, aanvullende info 17-03-2011)
6. In de longen van herkauwers kan *P. multocida* zonder behandeling chronische of ernstige pneumonie veroorzaken met vaak fatale gevolgen (B.3.3, aanvullende info 17-03-2011)
7. Toename van proliferatie en kolonisatie van *P. multocida* is vaak het gevolg van stress, zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen (B.3.5, B.3.6, aanvullende info 17-03-2011)
8. De *P. multocida* stam NADC-1062 is een serotype A stam die geïsoleerd is uit de longen van een kalf dat overleden is aan pneumonie (B.3.3, B.3.4)
9. Deze stam kan zich in longen van runderen vermenigvuldigen en kan zich verspreiden naar andere runderen (B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)
10. Aangezien de *P. multocida* stam NADC-1062 geïsoleerd is uit een kalf, zal de normale verspreidingsweg zijn van rund naar rund, via neus-neus contact. Het is onwaarschijnlijk dat deze stam zich vanuit de longen via neus-neus contact kan verspreiden naar mensen. De kans op het ontstaan van ziekte bij de mens is daardoor zeer gering (aanvullende info 17-03-2011)
11. In kalkoenen is de *P. multocida* stam NADC-1062 avirulent; de stam kan zich in deze vogels niet goed vermenigvuldigen (B.3.4, aanvullende info 17-03-2011)

12. *M. haemolytica* biotype A, serotype 1 (*M. haemolytica* A1) is een bacterie met een gastheerbereik dat beperkt is tot uitsluitend herkauwers (B.3.3, B.3.5, B.3.6, aanvullende info 17-03-2011)
13. *M. haemolytica* A1 veroorzaakt zelden ziekte in andere diersoorten (B.3.3, B.3.5)
14. De bacterie *M. haemolytica* A1 komt veel voor in de bovenste delen van de luchtwegen van gezonde runderen. Stress factoren zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of infecties met andere micro-organismen veroorzaken een sterke proliferatie en kolonisatie van de bacterie in de luchtwegen. (B.3.3, B.3.5, B.3.6, aanvullende info 17-03-2011)
15. De *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153 is geïsoleerd uit de longen van een kalf dat overleden is aan pneumonie (B.3.3, B.3.4, B.3.5)
16. Deze stam kan zich in longen van runderen vermenigvuldigen en kan zich verspreiden naar andere runderen (B.3.3, B.3.4, B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)*
17. Aangezien de *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153 geïsoleerd is uit een kalf, zal de normale verspreidingsweg zijn van rund naar rund, via neus-neus contact. Het is onwaarschijnlijk dat deze stam zich vanuit de longen via neus-neus contact kan verspreiden naar mensen. De kans op het ontstaan van ziekte bij de mens is daardoor zeer gering (B.3.3, B.3.4, B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)*
18. Genoverdracht van de *M. haemolytica* stam NADC-D153 naar andere bacteriën is nooit waargenomen (B.3.7)
19. *P. multocida* en *M. haemolytica* behoren tot de familie *Pasteurellaceae* en zijn sterk aangepast aan de gastheer. Buiten de gastheer kunnen de bacteriën niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Beide soorten vormen ook geen overlevingsstructuren zoals sporen. (B.3.5, B.3.6, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
20. Beide bacteriën zijn sterk aangepast aan de gastheer en hebben geen eigenschappen om buiten de gastheer langdurig te overleven (B.3.6, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
21. Zowel *P. multocida* als *M. haemolytica* zijn in gezonde dieren niet in staat een systemische infectie te veroorzaken, maar alleen een lokale infectie zoals pneumonie of wondinfectie (E.4)
22. In runderen worden beide bacteriën voornamelijk overgedragen vanuit de longen via neus-neus transmissie (B.3.5, B.3.6, aanvullende info 17-03-2011)
23. De *P. multocida* stam NADC-1062 en *M. haemolytica* stam NADC-D153 bezitten geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn (B.3.7)

B. De genetische modificatie:

24. Het kapsel van *P. multocida* serogroep A bestaat uit hyaluronid acid, een suikerpolymeër van D-glucuronid acid en N-acetyl-D-glucosamine. Het *P. multocida* serogroep A locus op het genoom bestaat uit drie regio's. De tweede regio bevat vijf genen (*hyaE*, *hyaD*, *hyaC*, *hyaB* en *hyaA*) die een rol spelen bij de synthese van de polysaccharide monomeren D-glucuronid acid en N-acetyl-D-glucosamine. (B.3.9)
25. Uit de *P. multocida* stam NADC-1062 is het *hyaE* gen verwijderd dat codeert voor een enzym betrokken bij de synthese van hyaluronid acid. Als gevolg van de deletie zal de recombinante *P. multocida* een kapselloos fenotype hebben, waardoor de bacterie veel makkelijker door het immuunsysteem kan worden vernietigd (B.3.9, aanvullende info 17-03-2011)*.
26. De *P. multocida* deletiemutant is op de volgende manier verkregen. Via recombinant DNA technologie is een *hyaE* genfragment gemaakt waarbij een gedeelte van 366 basenparen verwijderd is en vervangen door drie linkers van totaal 24 basenparen. Een vector met daarin het gemuteerde *hyaE* genfragment en een Tn903 kanamycine resistentiegen met een temperatuurgevoelige origin of replication (ori) van plasmide pBB192 is via electroporatie in de *P. multocida* stam NADC-1062 gebracht. Door de bacteriën te kweken in aanwezigheid van kanamycine zijn bacteriën geselecteerd die de vector met het kanamycine resistentiegen opgenomen hebben. Door de

- aanwezigheid van een temperatuur gevoelige ori zijn vervolgens bij een temperatuur van 40 graden celsius alleen die bacteriën geselecteerd die de vector ten koste van het *hyaE* gen opgenomen hebben via homologe recombinatie. Door te kweken zonder kanamycine selectie onder normale temperatuur konden die bacteriën (*P. multocida delta-hyaE*) geselecteerd worden die geen vectorsequenties in zich hebben, maar alleen het gemuteerde *hyaE* genfragment. Deze mutatie in *P. multocida* zal resulteren in een kapselloos fenotype. (B.3.9)
27. Uit de *M. haemolytica* stam NADC-D153 is het *lktA* gen verwijderd dat codeert voor het leukotoxine (B.3.9, aanvullende info 17-03-2011)
 28. Leukotoxine (Lkt) van *M. haemolytica* is een van de belangrijkste factoren die een rol spelen bij longaandoeningen veroorzaakt door deze bacterie (B.3.5, aanvullende info 17-03-2011)
 29. Leukotoxine is cytolytisch voor leukocyten en bloedplaatjes van alleen herkauwers. Hierdoor worden leukocyten op de plaats van infectie vernietigd waardoor de afweer verminderd wordt (B.3.5)
 30. Het leukotoxine speelt een belangrijke rol in de pathogenese van runder pneumonie pasteurellose (B.3.5)
 31. Het leukotoxine locus in het genoom bestaat uit de vier genen *lktA*, *lktB*, *lktC* en *lktD*. Het *lktA* gen codeert voor het toxine, het *lktC* gen codeert voor een eiwit dat het toxine post-translationeel activeert, en de *lktB* en *lktD* genproducten spelen een rol bij het transport van het leukotoxine in de cel (B.3.9)
 32. De *M. haemolytic lktA* deletiemutant is op de volgende manier verkregen. Via recombinant DNA technologie is een *lktA* genfragment gemaakt waarbij een gedeelte van 1033 basenparen verwijderd is. Een temperatuurgevoelige vector pBB80C met daarin het gemuteerde *lktA* genfragment en een kanamycine resistentiegen is via electroporatie in de *M. haemolytica* stam NADC-D153 gebracht. Door de bacteriën te kweken in aanwezigheid van kanamycine worden alleen die bacteriën geselecteerd die de vector met het kanamycine resistentiegen opgenomen hebben. Doordat het plasmide temperatuurgevoelig is, kunnen vervolgens bij een temperatuur van 40 graden celsius alleen die bacteriën geselecteerd worden die de vector ten koste van het *lktA* gen opgenomen hebben via homologe recombinatie. Door te kweken zonder kanamycine selectie onder normale temperatuur konden die bacteriën (*M. haemolytica* Lkt-) geselecteerd worden die geen vectorsequenties in zich dragen, maar alleen het gemuteerde *lktA* genfragment. Deze mutatie in *M. haemolytic* zal resulteren in het verlies van de door leukotoxine veroorzaakte cytolytische activiteit. (B.3.9)
 33. De in de deletiemutanten verwijderde genen *hyaE* en *lktA* zijn bewezen virulentiefactoren voor respectievelijk *P. multocida* en *M. haemolytica* (aanvullende info 15-11-2010)

Tabel 1. Vaststelling van de bij de genetische modificatie ingebrachte of verwijderde sequenties

Coderende sequenties gebruikt voor genetische modificatie	Herkomst	Plaats in de vector	Aanwezigheid in patiënt of proefdier
Afwezigheid van een deel van het <i>hyaE</i> gen	<i>P. multocida</i>	-	Niet meer functioneel – gedeeltelijke deletie
Afwezigheid van een deel van het <i>lktA</i> gen	<i>M. haemolytica</i>	-	Niet meer functioneel – gedeeltelijke

			deletie
--	--	--	---------

C. Het GGO:

34. Als gevolg van de deleties zijn beide bacteriën (*P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt-) geattenuëerd en daardoor minder goed in staat te overleven in de gastheer ten opzichte van de wild type bacteriën (B.3.11, B.3.12, aanvullende info 17-03-2011)
35. Het mogelijke effect van het GGO op het milieu en contact dieren is verwaarloosbaar klein aangezien het GGO niet kan overleven buiten de gastheer en omdat het GGO verminderd virulent is (B.3.13, F.1, F.2, aanvullende info 17-03-2011)
36. Reversie van de deleties in *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- kan in theorie optreden in aanwezigheid van wildtype bacteriën. Alle kalveren zijn in principe drager van wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica*. Aangezien de vaccinstammen 'schone' deletiemutanten zijn waarbij geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties achtergebleven zijn in het genoom, zal een eventuele reversie in het uiterste geval kunnen leiden tot respectievelijk wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica* (F.1, F.2, aanvullende info 17-03-2011).

D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten

37. Een studie in muizen toont dat de LD50 waarde voor de *P. multocida delta-hyaE* stam een factor 400 hoger ligt in vergelijking met de wildtype ouderstam (C1, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
38. Een intranasale vaccinatie van konijnen, kippen en schapen met een respectievelijke dosis van $1,1 \times 10^9$ CFU (kolonievormende eenheden), $6,2 \times 10^8$ CFU en $7,0 \times 10^8$ CFU van *P. multocida delta-hyaE* toont aan dat het vaccin veilig is voor deze dieren en dat de kans klein is dat het GGO naar het milieu kan verspreiden. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook het post-mortem onderzoek leverde geen aanwijzingen voor nadelige effecten van de studie (C.1, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
39. Subcutane vaccinatie van kalveren met een dosis van 5×10^8 CFU van *P. multocida delta-hyaE* toont aan dat het GGO bij deze dosis en onder deze omstandigheden geen direct zichtbare of meetbare nadelige effecten heeft. Een 10x hogere subcutane dosis zorgt in kalveren voor koorts, lethargie en kortademigheid. Er zijn geen indicaties voor verspreiding naar het milieu na subcutane vaccinatie (C.1, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
40. Studies met *P. multocida delta-hyaE* hebben aangetoond dat de bacterie niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen (aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
41. Een gemuteerde *M. haemolytica* stam S9B0071 die geen detecteerbaar leukotoxine produceert heeft een verminderde virulentie in zowel geiten als runderen in vergelijking met de wild type stam van hetzelfde serotype. In deze studie werd een 10^3 maal lagere mortaliteit en long laesie score waargenomen met de gemuteerde stam in vergelijking met de wild type stam (B.3.5)
42. Een LD50 studie in muizen heeft aangetoond dat na intraperitoneale vaccinatie met *M. haemolytica* Lkt-, de deletiemutant minder virulent is dan de wild type bacterie. De LD50 waarde van *M. haemolytica* Lkt- in muizen is een factor 5,4 hoger in vergelijking met de wildtype ouderstam (C.1, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
43. Subcutane en intranasale vaccinatiestudies van kalveren met *M. haemolytica* Lkt-tonen aan dat het vaccin veilig is en dat de intranasaal gevaccineerde dieren het GGO kunnen verspreiden naar contact dieren (C.1, aanvullende info 17-03-2011)

44. In schapen is aangetoond dat een intranasale vaccinatie met een dosis van $4,8 \times 10^9$ CFU (20x hogere dosis dan de te verwachten studiedosis) met *M. haemolytica* Lkt- veilig is. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook tijdens het post-mortem onderzoek werden geen nadelige effecten van de studie gevonden (C.1, aanvullende info 17-03-2011).
45. Subcutane vaccinatiestudies in kalveren met een dosis van $7,4 \times 10^9$ CFU van *M. haemolytica* Lkt- tonen aan dat het GGO op de injectieplaats blijft en daarbij niet naar de longen migreert. Het vrijkomen van het vaccin vanuit de subcutaan gevaccineerde dieren is niet waargenomen (C.1, aanvullende info 17-03-2011)
46. Na intranasale toediening van *M. haemolytica* Lkt- aan kalveren bleek dat de vaccinstam voor tenminste 22 dagen uitgescheiden werd. Het GGO bleef enige tijd aanwezig in de bovenste luchtwegen en daarmee kan de bacterie via niezen en/of neuscontact uitgescheiden en verspreid worden (C1, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
47. Studies met *M. haemolytica* Lkt- tonen aan dat de bacterie gedurende 28 dagen na incubatie in aarde of vijverwater niet in aantal toenam en/of overleefde bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen (aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
48. Subcutane vaccinatie met een combinatie van beide vaccins ($2,2 \times 10^8$ CFU *M. haemolytica* Lkt- en $2,0 \times 10^7$ CFU *P. multocida delta-hyaE*) in kalveren heeft aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 7-8 weken oude kalveren. Bij deze dosis en ook bij een 10x hogere dosis zijn met beide vaccins geen nadelige effecten waargenomen (C.1, aanvullende info 17-03-2011)
49. Subcutane vaccinatiestudies in de nek met beide deletiemutanten hebben aangetoond dat beide GGO's op de plaats van injectie blijven of migreren naar de regionale lymfeklieren. De GGO's waren drie weken na injectie niet meer detecteerbaar in de injectieplaats (B.3.13, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
50. Deze studie toont ook aan dat de beide GGO's niet kunnen vrijkomen uit kalveren die subcutaan gevaccineerd zijn met een 10x hogere dosis. Uit neus swabs konden geen GGO's geïsoleerd worden en er trad geen seroconversie op in contact controle kalveren (B.3.13, aanvullende info 17-03-2011)
51. In een studie in de Verenigde Staten waarbij 803 kalveren subcutaan geïnjecteerd werden met een vaccin met daarin beide GGO's heeft aangetoond het vaccin veilig te gebruiken is in 4-8 weken oude kalveren. Er zijn geen nadelige effecten gerapporteerd (C.1, aanvullende info 17-03-2011)
52. De genetisch gemodificeerde bacteriën kunnen niet in het milieu terecht komen bij een subcutane vaccinatie van dieren. De bacteriën blijven tijdelijk aanwezig op de injectieplaats en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam (B.3.13, F.1, aanvullende info 17-03-2011)
53. Het GGO vaccin kan alleen in het milieu terecht komen tijdens de toediening bij accidentele breuk van de batch of morsen (B.3.13)
54. Bij intranasale toediening is de kans aanwezig dat de GGO's via shedding in het milieu terecht kunnen komen en contact dieren kunnen infecteren (B.3.13, F.1, aanvullende info 17-03-2011)

E. Proefdiergebonden aspecten:

55. Het doel van de studie is het ontwikkelen van een vaccin tegen *Pasteurella* en *Mannheimia* pneumonie in runderen (A.5)
56. De vaccinatie werkzaamheden zullen worden uitgevoerd op de locatie van Intervet in Sint Anthonis (aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
57. Proefdieren worden geselecteerd op algemene gezondheidstoestand en zijn 1 tot 16 weken oud (E.2, G.1).
58. Er zullen maximaal 4000 kalveren gevaccineerd worden (E.1)

59. Het GGO vaccin wordt subcutaan vanaf 3 weken leeftijd en intranasaal vanaf 1 week leeftijd aan de dieren toegediend (E.3).
60. Dosis varieert van 10E5 CFU tot 10E11 CFU per dosis, welke toegediend wordt in maximaal vier doseringen met een interval van maximaal vier weken (E.2, aanvullende info 29-04-2011).
61. Het bacteriële vaccin zal gecombineerd worden met levend verzwakt wildtype BRSV (*Bovine Respiratory Syncytial Virus*) virus, Pi3 (para-influenza) virus en/of BHV (*bovine herpesvirus* / IBR, *Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus*) virus (aanvullende info 29-04-2011)
62. Afhankelijk van het doel van de studie zal er een challenge plaatsvinden met de wildtype bacteriën 6 weken of 6 maanden na de eerste toediening van het vaccin (aanvullende info 15-11-2010)
63. Na challenge worden er neusswabs genomen worden om de challenge stam aan te tonen. Na subcutane vaccinatie is de kans zeer klein dat er in deze monsters GGO's zitten. Na intranasale vaccinatie is de kans reëel dat daar GGO's in zitten (E.4, G.6).
64. Voor antilichaam titraties worden bloedmonsters genomen. De kans dat in deze monsters het GGO vaccin zit is heel erg klein na zowel subcutane als na intranasale vaccinatie (E.4, G.6)
65. Alle monsters zullen worden getest in een bacteriologisch laboratorium onder vergunning IG 94-024 (G.6, aanvullende info 15-11-2010)
66. Alle proeven worden beëindigd met een post-mortem onderzoek en de kadavers zullen worden aangeboden voor destructie aan een destructiebedrijf als categorie 1 materiaal; uitsluitend geschikt voor vernietiging (aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
67. In geval van een safety proef wordt de proef uiterlijk 6 weken na de eerste toediening van het vaccin afgelopen beëindigd met een post-mortem onderzoek. In geval van een werkzaamheidsproef wordt de proef 1 week na de challenge beëindigd met een post-mortem onderzoek (aanvullende info 15-11-2010)

F. Informatie over plannen voor beheersing, controle, follow-up en afvalbehandeling:

68. Voor de vaccinatieproeven worden geen risicobeheermaatregelen getroffen aangezien de vaccinstammen niet pathogeen zijn voor mensen of kalveren en omdat de bacteriën buiten de gastheer beperkte tijd kunnen overleven (G.4).
69. Dieren worden gehouden volgens normale farm routines in stallen of dubbel afgerasterde weilanden (E.5, G.3, G.4, aanvullende info 15-11-2010, aanvullende info 17-03-2011)
70. Proefdieren komen gedurende de proef niet in direct contact komen met dieren die geen deel uitmaken van de proef (E.5, aanvullende info 17-03-2011)
71. Hoewel onwaarschijnlijk, kan niet worden uitgesloten dat de gevaccineerde kalveren bij conventionele huisvesting of in de weide in contact komen met andere dieren, waaronder knaagdieren en vogels (aanvullende info 15-11-2010)
72. Indien een gevaccineerd dier komt te overlijden dan zal er sectie worden verricht en zullen monsters worden afgenomen om de doodsoorzaak te onderzoeken. Het kadaver zal volgens normale farm routines worden afgevoerd. Dit houdt in dat kadavers worden aangeboden aan een destructiebedrijf als categorie 1 materiaal; uitsluitend geschikt voor vernietiging. (G.5, aanvullende info 17-03-2011)
73. Na subcutane vaccinatie blijft het GGO tijdelijk op de injectieplaats aanwezig. Na intranasale toediening kunnen de vaccinstammen langer aanwezig blijven en uitgescheiden worden. Detectie en monitoring van het GGO is niet opgezet omdat dit alleen bevestigd zal worden (H1, H.2)
74. Alleen na intranasale toediening kan tijdelijk uitscheiding van de GGO's optreden. Hierdoor kan de strooisellaag na hoesten, niesen of via speeksel besmet raken met het GGO. Stro en mest zullen via normale farm routines worden afgevoerd en verwerkt, wat onder andere inhoudt dat een deel op het land uitgereden wordt (H.3, aanvullende info 17-03-2011)

75. Er worden geen maatregelen in acht genomen om verspreiding van het GGO tegen te gaan (H.4, aanvullende info 17-03-2011)

G. Productie en Batch

76. Productie van het GGO vindt plaats bij Intervet te Boxmeer onder IG vergunning IG 94-024 (D.1, aanvullende informatie 31-05-2011).
77. Productie van de cultuur vindt plaats op vloeibaar medium. Na groei wordt de cultuur gevriesdroogd. Kwaliteitscontrole vindt plaats op de criteria: hoeveelheid restvocht, reinheid, levendtelling en determinatie. Daarnaast vindt er een PCR test plaats ter bevestiging van de deletie. Tevens wordt een determinatie analyse toegepast om aan te tonen dat er in de batches de juiste bacteriën zitten (D.2, D.3)



DEEL 2. MILIEURISICOANALYSE VAN DE AANGEVRAAGDE WERKZAAMHEDEN

Per sequentie wordt geïnventariseerd welke nieuwe eigenschappen en effecten mogelijk het gevolg zijn van de nieuw ingebrachte sequenties. De “oorzaak-gevolg” relaties tussen de genetische modificatie en het eventuele schadelijke effect worden verduidelijkt. Daarna volgt de evaluatie van de eventuele gevolgen en de waarschijnlijkheid. De milieurisicoanalyse van de aangevraagde werkzaamheden wordt afgesloten met een deelrisicoschatting per eigenschap en sequentie.

Tabel 2.1 milieurisicoanalyse van de deletiemutant *Pasteurella multocida* (*P. multocida* delta-*hyaE*):

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben (Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties)	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden (rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is
A. Persistentie en invasiviteit		
Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een GGO toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit, en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu. Van een hogere persistentie en invasiviteit van bijvoorbeeld een bacterie (i.e. het GGO) ten opzichte van de natuurlijk voorkomende wildtype bacterie waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan de wildtype bacterie in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van het GGO in het milieu, en deze shedding leidt tot infectie van andere organismen. Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het GGO door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol. Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren. De gebruikte genetisch gemodificeerde bacterie is ontwikkeld door een gedeelte van het <i>hyaE</i> gen uit de <i>P. multocida</i> stam	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Wildtype <i>P. multocida</i> is een bacterie die wereldwijd voorkomt in het respiratoire- en spijsverteringskanaal in verscheidene dieren. Elk serotype van <i>P. multocida</i> is sterk aangepast aan zijn eigen specifieke gastheer en transmissie van de bacterie naar andere gastheersoorten komt niet veel voor. <i>P. multocida</i> serotype A is een veelvoorkomende infectie in herkauwers met respiratoire aandoeningen. Runderen zijn de gastheer voor de <i>P. multocida</i> serotype A stam NADC-1062 die gebruikt is voor de constructie van het GGO. Als gevolg van stress, zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kan <i>P. multocida</i> sterk vermenigvuldigen in de longen en kan daar zonder behandeling een chronische of ernstige pneumonie veroorzaken met vaak fatale afloop. Een systemische infectie komt in gezonde dieren niet voor. De <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden. Overdracht van de bacterie vindt voornamelijk plaats vanuit de longen via neus-neus transmissie. <i>P. multocida</i> behoort tot de familie <i>Pasteurellaceae</i> en vormt geen overlevingsstructuren zoals sporen. <i>P. multocida</i> is sterk aangepast aan de gastheer	I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer, maar alleen als de virulentie van het organisme intact is. II. De waarschijnlijkheid: Door de introductie van de deletie in het genoom van de <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 is het GGO veranderd in persistentie en invasiviteit. Er is sprake van attenuering in de gastheer. Het verwijderde <i>hyaE</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. Buiten de gastheer in het milieu is het GGO niet in staat om zich te handhaven, evenmin als in de gastheer. De waarschijnlijkheid dat deze eigenschappen leiden tot verhoogde persistentie of invasiviteit is te verwaarlozen. III. Het risico: Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit van de bacterie is verwaarloosbaar klein.



NADC-1062 te verwijderen met behulp van een recombinant DNA techniek. Op deze manier is er een 'schone' deletiemutant gecreëerd, dat wil zeggen dat er van het oorspronkelijk geïnserteerde genetisch materiaal slechts enkele linker nucleotiden zijn achtergebleven. In het genoom zijn geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties achtergebleven. Het resultaat is dat het GGO een eiwit mist voor de synthese van hyaluronic acid en daardoor een kapselloos fenotype zal hebben. Hierdoor is de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd ten opzichte van de wildtype bacterie. Doordat het GGO verminderd virulent is zal de vaccinstam onder deze omstandigheden en toepassing geen pneumonie veroorzaken. Het is hierbij de vraag of deze deletie in het genoom leiden tot een verandering in persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot wildtype <i>P. multocida</i>.	en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (<i>P. multocida delta-hyaE</i>) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO mist een eiwit voor de synthese van hyaluronic acid en heeft daardoor een kapselloos fenotype. Hierdoor kan de bacterie veel makkelijker door het immuunsysteem vernietigd worden. Het verwijderde <i>hyaE</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. De vaccinstam kan wel nog immuniteit opleveren tegen <i>P. multocida</i>. De gastheerspecificiteit van het GGO is niet gewijzigd aangezien het verwijderde gen hierin geen rol speelt. De vaccinstam blijft na subcutane toediening tijdelijk aanwezig op de injectieplaats en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam. Een subcutane vaccinatiestudie in de nek van kalveren heeft aangetoond dat het GGO op de plaats van injectie blijft of migreert naar de regionale lymfeklieren. De vaccinstam was drie weken na injectie niet meer detecteerbaar in de injectieplaats. In een studie in de Verenigde Staten waarbij 803 kalveren subcutaan geïnjecteerd werden met <i>P. multocida delta-hyaE</i> heeft aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 4-8 weken oude kalveren. Er zijn geen nadelige effecten gerapporteerd. Subcutane vaccinatie van kalveren met een dosis van 5x10E8 CFU van <i>P. multocida delta-hyaE</i> toont aan dat het GGO bij deze dosis en onder deze omstandigheden geen direct zichtbare of meetbare nadelige effecten heeft. Een 10x hogere subcutane dosis zorgt in kalveren voor koorts, lethargie en kortademigheid. Er zijn geen indicaties voor verspreiding naar het milieu na subcutane vaccinatie. Uit neus swabs konden geen GGO's geïsoleerd worden en er trad geen seroconversie op in contact controle kalveren. Subcutane vaccinatie met een combinatie van beide vaccins (2,2x10E8 CFU <i>M. haemolytica</i> Lkt- en 2,0x10E7 CFU <i>P. multocida delta-hyaE</i>) in kalveren heeft aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 7-8 weken oude kalveren. Bij deze dosis en ook een 10x hogere dosis onder deze omstandigheden toont aan dat beide vaccins geen nadelige effecten veroorzaakt. Een subcutane vaccinatie is een doodlopende weg voor het vaccin. Na intranasale toediening van <i>P. multocida delta-hyaE</i> aan kalveren toont aan dat het GGO geen nadelige effecten heeft en dat het vaccin wordt uitgescheiden. Het GGO blijft enige tijd	
---	--	--



	aanwezig in de bovenste luchtwegen en kan daarmee via niezen en/of neuscontact uitgescheiden worden in het milieu. Studies met <i>P. multocida delta-hyaE</i> hebben aangetoond dat de bacterie niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen.	
B. Selectieve voordelen		
Voor de milieurisicoanalyse van een GGO toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A. Het is hierbij de vraag of door de geïntroduceerde deletie in het genoom, leidt tot een selectief voordeel dat een verandering geeft in weefsel tropisme, gastheerbereik en de mate van infectiviteit en virulentie van de stam in vergelijking tot de wildtype <i>P. multocida</i>.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Evenals onder onderdeel A geldt dat indien de gevolgen van verhoogde invasiviteit van het GGO of uitbreiding van het gastheerbereik groot kunnen zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals reeds aangegeven onder onderdeel A van deze tabel, is het uiterst onwaarschijnlijk dat het afwezig zijn van het <i>hyaA</i> gen, een versterkend effect heeft op de biologie van de bacteriestam. Het verwijderde <i>hyaE</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. Van de geïntroduceerde deleties worden geen nadelige effecten verwacht die berusten op een verandering van infectiviteit, weefsel tropisme of gastheerbereik.	I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat het gedeleteerde gen leidt tot selectieve voordelen is te verwaarlozen. III. Het risico: Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de <i>P. multocida delta-hyaE</i> vaccinstam is verwaarloosbaar klein.
C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen		
Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het GGO naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin het GGO zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het GGO. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien. De vraag is of de deletie geheel of gedeeltelijk kan worden overgedragen naar andere bacteriestammen en of dit vervolgens voor deze stammen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor of nadelen kunnen alleen optreden als de deletie op een of andere manier een interactie heeft met de	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Eventuele homologe recombinatie tussen het GGO en de (wildtype) uitgangsstam zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Het GGO is een 'schone' deletiemutant, waarbij geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties achtergebleven zijn in het genoom. Aan een dergelijke uitwisseling is als enig gevolg verbonden dat de oorspronkelijke stam wordt teruggevormd. De aanwezige verzwakte wildtype virussen BRSV, Pi3 virus en/of BHV in het vaccin bezitten geen genen die de deletie in het GGO kunnen complementeren of genen die een rol spelen bij de biosynthese van het kapsel van <i>P. multocida</i>. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Reversie van een deletie in <i>P. multocida delta-hyaE</i> kan	I. Mogelijke gevolgen: Wanneer het GGO de deletie uitwisselt met een soortgelijke stam met een ander gastheerbereik, dan zal de stam ook geattenuëerd zijn in zijn gastheer. Aan homologe recombinatie zijn geen nadelige gevolgen verbonden. II. De waarschijnlijkheid: Aangezien er geen schadelijke effecten zijn geïdentificeerd is de vraag naar de waarschijnlijkheid niet relevant. III. Het risico: Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.



levenscyclus van de bacterie.	theoretisch optreden in aanwezigheid van wildtype bacteriën. Alle kalveren zijn in principe drager van wildtype <i>P. multocida</i> . Aangezien de vaccinstam een 'schone' deletiemutant is zal een eventuele reversie in het uiterste geval kunnen leiden tot een wildtype <i>P. multocida</i> bacterie. Aangezien er geen schadelijke effecten ten opzichte van de wildtype stam geïdentificeerd zijn is de vraag naar de waarschijnlijkheid niet relevant.	
-------------------------------	---	--



D. Effecten op doel en niet-doel populaties

Effecten op doel en niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het GGO in de omgeving van het proefdier. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A.

In dit onderdeel worden de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op dieren in de omgeving van het proefdier. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.

De vraag is welke effecten de deletie kan hebben op de niet-doelpopulatie. Gezien het gastheerbereik van de gebruikte *P. multocida* stam beperkt deze vraag zich in eerste instantie tot runderen, hoewel niet uit te sluiten is dat andere niet-doelwit organismen ook in aanraking kunnen komen met het GGO.

Met effecten worden schadelijke en niet-schadelijke effecten bedoeld, zoals eventuele toxische en allergene effecten.

Specifieke gezondheidseffecten voor de mens worden onderonderdeel E besproken. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de deletie kan hebben op de mens.

I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt

De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten in runderen zijn reeds besproken in onderdeel A van deze tabel. Wildtype *P. multocida* stam NADC-1062 is alleen ziekteverwekkend in runderen. Alleen als gevolg van stress, zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kan *P. multocida* sterk vermenigvuldigen in de longen en kan daar zonder behandeling een chronische of ernstige pneumonie veroorzaken met vaak fatale afloop. In kalkoenen is de *P. multocida* stam NADC-1062 avirulent en kan in deze vogels niet goed vermenigvuldigen. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (*P. multocida delta-hyaE*) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer.

Een studie in muizen toont dat de LD50 waarde voor de *P. multocida delta-hyaE* stam een factor 400 hoger ligt in vergelijking met de wildtype ouderstam. Een intranasale vaccinatie van konijnen, kippen en schapen met een respectievelijke dosis van $1,1 \times 10^9$ CFU, $6,2 \times 10^8$ CFU en $7,0 \times 10^8$ CFU van *P. multocida delta-hyaE* toont aan dat het vaccin veilig is voor deze dieren en dat de kans klein is dat het GGO naar het milieu kan verspreiden. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook het post-mortem onderzoek leverde geen aanwijzingen voor nadelige effecten van de studie.

De vaccinstam heeft zijn ziekteverwekkende vermogen verloren, maar kan het wel immuniteit opleveren tegen *P. multocida*.

II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect

Zoals besproken in onderdeel A kan alleen vanuit intranasaal gevaccineerde kalveren uitscheiding plaatsvinden. *P. multocida* behoort tot de familie *Pasteurellaceae* en vormt geen overlevingsstructuren zoals sporen. *P. multocida* is sterk aangepast aan de gastheer en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Studies met *P. multocida delta-hyaE* hebben aangetoond dat de bacterie niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen.

I. Mogelijke gevolgen:

De effecten op doel en niet-doel populaties van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.

II. De waarschijnlijkheid:

De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.

III. Het risico:

Het risico van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.



	De waarschijnlijkheid van het optreden van een schadelijk effect als gevolg van blootstelling aan het GGO verwaarloosbaar klein.	
--	--	--



E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of de deleties leiden tot verandering in weefsel tropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie in vergelijking met wildtype <i>P. multocida</i>. Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn aan de orde geweest in onderdeel D. Daarbij zijn de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op dieren in de omgeving van het proefdier. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel A en D van deze tabel. Wildtype <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 is alleen ziekteverwekkend in runderen. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (<i>P. multocida delta-hyaE</i>) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Humane isolaten van <i>P. multocida</i> tonen aan dat de meeste humane infecties gerelateerd zijn aan bijt- en krabwonden door geïnfecteerde katten en honden waardoor de bacterie direct in de bloedbaan terecht komt. Aangezien de <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 geïsoleerd is uit een kalf, is het onwaarschijnlijk dat deze stam zich vanuit de longen via neus-neus contact kan verspreiden naar mensen en daar ziekte kan veroorzaken. Elk serotype van <i>P. multocida</i> is sterk aangepast aan de gastheer en heeft geen eigenschappen om buiten de gastheer langdurig te overleven. De <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals in onderdeel A en D besproken is, is de kans dat het GGO vanuit gevaccineerde kalveren andere mensen kan infecteren en ziekte kan veroorzaken verwaarloosbaar klein.	I. Mogelijke gevolgen: De effecten op menselijke gezondheid van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.
F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie		
Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft, en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Er is geen sprake van consumptie. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.	I. Mogelijke gevolgen: Niet van toepassing. II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing. III. Het risico: Niet van toepassing.
G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu		
In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die GGO's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen, of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de	I. Mogelijke gevolgen: De effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu kunnen groot zijn als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, pathogeniteit of persistentie.



	gastheer. <i>P. multocida</i> behoort tot de familie <i>Pasteurellaceae</i> en vormt geen overlevingsstructuren zoals sporen. <i>P. multocida</i> is sterk aangepast aan de gastheer en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Het is onwaarschijnlijk dat als gevolg van de deletie schadelijke effecten optreden op de microbiële populaties. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Studies met <i>P. multocida delta-hyaE</i> hebben aangetoond dat de bacterie niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen. De kans dat er schadelijke effecten optreden is verwaarloosbaar klein.	II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein.
H. Ongewenste beïnvloeding van biogeochemische processen		
Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op biogeochemische processen ten gevolge van mogelijke directe en indirecte interacties van het GGO en doelwit- en niet-doelwitorganismen in de nabijheid van de GGO-introductie(s). Hieronder wordt verstaan dat het GGO een negatief effect heeft op (micro-) organismen in de bodem die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal. Factoren die een negatief effect kunnen hebben op nutriëntkringlopen of afbraak van organisch materiaal in de bodem zijn bijvoorbeeld toxische stoffen of stoffen die een anti-microbiële werking hebben. De vraag is of de deletie van het gen in <i>P. multocida</i> leidt tot anti-microbiële of toxische effecten op de bodem(micro)flora of fauna, waardoor de biogeochemische processen in de bodem kunnen worden beïnvloed.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel G van deze tabel. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO mist een eiwit voor de synthese van hyaluronic acid en heeft daardoor een kapselloos fenotype. Het verwijderde <i>hyaE</i> gen is een bewezen virulentiefactor voor <i>P. multocida</i>. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Aangezien het verwijderde gen betrokken is bij de synthese van hyaluronic acid in <i>P. multocida</i> en niet betrokken is bij biogeochemische processen, is het onwaarschijnlijk dat biogeochemische processen in de bodem worden beïnvloed.	I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op biogeochemische processen is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van negatieve effecten op het bodemleven is verwaarloosbaar klein.



I. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk		
Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de GGO's. Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het GGO kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen. De vraag is of de deletie in het genoom van <i>P. multocida</i> zal leiden tot veranderingen in de medische of veterinaire praktijk.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De <i>P. multocida</i> stam NADC-1062 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Er zijn geen schadelijke effecten op verandering in de medische of veterinaire praktijk te identificeren. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het GGO is evenals het wildtype gevoelig voor antibiotica. Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.	I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten. II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing. III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.



Tabel 2.2 milieurisicoanalyse van de deletiemutant *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica* Lkt-):

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben (<i>Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties</i>)	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden (<i>rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu</i>)	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is
A. Persistentie en invasiviteit		
Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een GGO toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit, en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu. Van een hogere persistentie en invasiviteit van bijvoorbeeld een bacterie (i.e. het GGO) ten opzichte van de natuurlijk voorkomende wildtype bacterie waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan de wildtype bacterie in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van het GGO in het milieu, en deze shedding leidt tot infectie van andere organismen. Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het GGO door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefsel tropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol. Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren. De gebruikte genetisch gemodificeerde bacterie is ontwikkeld door het <i>lktA</i> gen uit <i>M. haemolytica</i> stam NADC-D153 te verwijderen met behulp van een recombinant DNA techniek. Op deze manier is er een ‘schone’ deletiemutant gecreëerd. In het genoom zijn geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties achtergebleven. Het resultaat is dat het GGO het Leukotoxine eiwit mist dat cytolytisch is voor leukocyten en bloedplaatjes van alleen herkauwers. Leukotoxine speelt een belangrijke rol in de pathogenese van runder pneumonie	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Wildtype <i>M. haemolytica</i> biotype A, serotype 1 (<i>M. haemolytica</i> A1) is een bacterie met een gastheerbereik dat beperkt is tot uitsluitend herkauwers. De bacterie <i>M. haemolytica</i> A1 komt veel voor in de bovenste delen van de luchtwegen van gezonde runderen. Elk serotype van <i>M. haemolytica</i> is sterk aangepast aan zijn eigen specifieke gastheer en transmissie naar andere soorten komt niet veel voor. Als gevolg van stress zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kan <i>M. haemolytica</i> zich sterk vermenigvuldigen in de longen. Een systemische infectie komt in gezonde dieren niet voor. De <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 die gebruikt is voor de constructie van het GGO is geïsoleerd uit de longen van een kalf dat overleden is aan pneumonie. De <i>M. haemolytica</i> stam NADC-D153 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan in de meeste gevallen adequaat met antibiotica behandeld worden. Overdracht van de bacterie vindt voornamelijk plaats vanuit de longen via neus-neus transmissie. <i>M. haemolytica</i> behoort tot de familie <i>Pasteurellaceae</i> en vormt geen overlevings-structuren zoals sporen. <i>M. haemolytica</i> is sterk aangepast aan de gastheer en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (<i>M. haemolytica</i> Lkt-) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO mist het Leukotoxine (Lkt) eiwit dat cytolytisch is voor leukocyten en bloedplaatjes	I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer, maar alleen als de virulentie van het organisme intact is. II. De waarschijnlijkheid: Door de introductie van de deletie in het genoom van de <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 is het GGO veranderd in persistentie en invasiviteit. Er is sprake van attenuering in de gastheer. Het verwijderde <i>lktA</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. Buiten de gastheer in het milieu is het GGO niet in staat om zich te handhaven, evenmin als in de gastheer. De waarschijnlijkheid dat deze eigenschappen leiden tot verhoogde persistentie of invasiviteit is te verwaarlozen. III. Het risico: Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit van de bacterie is verwaarloosbaar klein.



pasteurellose. Doordat het GGO verminderd virulent is zal de vaccinstam onder deze omstandigheden en toepassing geen ziekte veroorzaken. Het is hierbij de vraag of deze deletie in het genoom leiden tot een verandering in persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot wildtype <i>M. haemolytica</i>.	van alleen herkauwers. Het Lkt eiwit zorgt ervoor dat leukocyten op de plaats van infectie vernietigd worden waardoor de afweer tegen de bacteriële infectie verminderd wordt. Leukotoxine is een van de belangrijkste virulentie factoren van <i>M. haemolytica</i> en speelt een belangrijke rol in de pathogenese van runder pneumonie pasteurellose. Het verwijderde <i>lktA</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. De vaccinstam kan wel nog immuniteit opleveren tegen <i>M. haemolytica</i>. De gastheerspecificiteit van het GGO is niet gewijzigd aangezien het verwijderde gen hierin geen rol speelt. De vaccinstam blijft na subcutane toediening tijdelijk aanwezig op de injectieplaats en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam. Een subcutane vaccinatiestudie in de nek van kalveren heeft aangetoond dat het GGO op de plaats van injectie blijft of migreert naar de regionale lymfeklieren. De vaccinstam was drie weken na injectie niet meer detecteerbaar in de injectieplaats. In een studie in de Verenigde Staten waarbij 803 kalveren subcutaan geïnjecteerd werden met <i>M. haemolytica</i> Lkt- heeft aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 4-8 weken oude kalveren. Er zijn geen nadelige effecten gerapporteerd. Subcutane vaccinatie in kalveren met een dosis van $7,4 \times 10^9$ CFU van <i>M. haemolytica</i> Lkt- toont aan dat het GGO veilig is in kalveren. Het GGO blijft op de injectieplaats en migreert niet naar de longen. Het vrijkomen van het vaccin vanuit de subcutaan gevaccineerde dieren is niet waargenomen. Uit neus swabs konden geen GGO's geïsoleerd worden en er trad geen seroconversie op in contact controle kalveren. Subcutane vaccinatie met een combinatie van beide vaccins ($2,2 \times 10^8$ CFU <i>M. haemolytica</i> Lkt- en $2,0 \times 10^7$ CFU <i>P. multocida delta-hyaE</i>) in kalveren heeft aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 7-8 weken oude kalveren. Bij deze dosis en ook een 10x hogere dosis onder deze omstandigheden toont aan dat beide vaccins geen nadelige effecten veroorzaakt. Een subcutane vaccinatie is een doodlopende weg voor het vaccin. Na intranasale toediening van <i>M. haemolytica</i> Lkt- aan kalveren bleek dat de vaccinstam voor tenminste 22 dagen uitgescheiden werd. Het GGO bleef enige tijd aanwezig in de bovenste luchtwegen en daarmee kan de bacterie via niezen en/of neuscontact uitgescheiden en verspreid worden. Studies met <i>M. haemolytica</i> Lkt- hebben aangetoond dat de bacterie gedurende 28 dagen na incubatie in aarde of vijverwater niet in aantallen toenam en/of overleefde bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte	
---	--	--



	tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen.	
B. Selectieve voordelen		
Voor de milieurisicoanalyse van een GGO toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A. Het is hierbij de vraag of door de geïntroduceerde deletie in het genoom, leidt tot een selectief voordeel dat een verandering geeft in weefseltropisme, gastheerbereik en de mate van infectiviteit en virulentie van de stam in vergelijking tot de wildtype <i>M. haemolytica</i>.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Evenals onder onderdeel A geldt dat indien de gevolgen van verhoogde invasiviteit van het GGO of uitbreiding van het gastheerbereik groot kunnen zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals reeds aangegeven onder onderdeel A van deze tabel, is het uiterst onwaarschijnlijk dat het afwezig zijn van het <i>lktA</i> gen, een versterkend effect heeft op de biologie van de bacteriestam. Het verwijderde <i>lktA</i> gen is een bewezen virulentiefactor waardoor de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van de wildtype bacterie. Van de geïntroduceerde deleties worden geen nadelige effecten verwacht die berusten op een verandering van infectiviteit, weefseltropisme of gastheerbereik.	I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat het gedeleteerde gen leidt tot selectieve voordelen is te verwaarlozen. III. Het risico: Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de <i>M. haemolytica</i> Lkt- vaccinstam is verwaarloosbaar klein.
C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen		
Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het GGO naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin het GGO zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het GGO. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien. De vraag is of de deletie geheel of gedeeltelijk kan worden overgedragen naar andere bacteriestammen en of dit vervolgens voor deze stammen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor of nadelen kunnen alleen optreden als de deletie op een of andere manier een interactie heeft met de levenscyclus van de bacterie.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Eventuele homologe recombinatie tussen het GGO en de (wildtype) uitgangsstam zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Het GGO is een 'schone' deletiemutant, waarbij geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties achtergebleven zijn in het genoom. Aan een dergelijke uitwisseling is als enig gevolg verbonden dat de oorspronkelijke stam wordt teruggevormd. De aanwezige verzwakte wildtype virussen BRSV, Pi3 virus en/of BHV in het vaccin bezitten geen genen die de deletie in het GGO kunnen complementeren of genen die een rol spelen bij de biosynthese van het leukotoxine van <i>M. haemolytica</i>. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Reversie van een deletie in <i>M. haemolytica</i> Lkt- kan theoretisch optreden in aanwezigheid van wildtype bacteriën. Alle kalveren zijn in principe drager van wildtype <i>M. haemolytica</i>. Aangezien de vaccinstam een 'schone' deletiemutant is zal een eventuele reversie in het uiterste geval kunnen leiden tot een wildtype <i>M. haemolytica</i> bacterie. Genoverdracht bij de <i>M. haemolytica</i> stam NADC-D153 naar	I. Mogelijke gevolgen: Wanneer het GGO de deletie uitwisselt met een soortgelijke stam met een ander gastheerbereik, dan zal de stam ook geïntenuueerd zijn in zijn gastheer. Aan homologe recombinatie zijn geen nadelige gevolgen verbonden. II. De waarschijnlijkheid: Aangezien er geen schadelijke effecten zijn geïdentificeerd is de vraag naar de waarschijnlijkheid niet relevant. III. Het risico: Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.



	andere bacteriën is nooit waargenomen. Aangezien er geen schadelijke effecten geïdentificeerd zijn is de vraag naar de waarschijnlijkheid niet relevant.	
--	--	--



D. Effecten op doel en niet-doel populaties		
Effecten op doel en niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het GGO in de omgeving van het proefdier. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A. In dit onderdeel worden de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op dieren in de omgeving van het proefdier. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling. De vraag is welke effecten de deletie kan hebben op de niet-doelpopulatie. Gezien het gastheerbereik van de gebruikte <i>M. haemolytica</i> stam beperkt deze vraag zich in eerste instantie tot runderen, hoewel niet uit te sluiten is dat andere niet-doelwit organismen ook in aanraking kunnen komen met het GGO Met effecten worden schadelijke en niet-schadelijke effecten bedoeld, zoals eventuele toxische en allergene effecten. Specifieke gezondheidseffecten voor de mens worden onderonderdeel E besproken. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de deletie kan hebben op de mens.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten in runderen zijn reeds besproken in onderdeel A van deze tabel. Wildtype <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 is alleen ziekteverwekkend in runderen. Als gevolg van stress zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kan <i>M. haemolytica</i> zich sterk vermenigvuldigen in de longen. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (<i>M. haemolytica</i> Lkt-) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Een intraperitoneale vaccinatie studie in muizen toont dat de LD50 waarde voor <i>M. haemolytica</i> Lkt- een factor 5,4 hoger ligt in vergelijking met de wildtype ouderstam. Een gemuteerde <i>M. haemolytica</i> stam S9B0071 die geen detecteerbaar leukotoxine produceert heeft een verminderde virulentie in zowel geiten als runderen in vergelijking met de wild type stam van hetzelfde serotype. In deze studie werd een duizend maal lagere mortaliteit en long laesie score waargenomen met de gemuteerde stam in vergelijking met de wild type stam. In schapen is aangetoond dat een intranasale vaccinatie met een dosis van $4,8 \times 10^9$ CFU (20x hogere dan de te verwachten studiedosis) met <i>M. haemolytica</i> Lkt- veilig is. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook het post-mortem onderzoek leverde geen aanwijzingen voor nadelige effecten van de studie. De vaccinstam heeft zijn ziekteverwekkende vermogen verloren, maar kan het wel immuniteit opleveren tegen <i>M. haemolytica</i>. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals besproken in onderdeel A kan alleen vanuit intranasaal gevaccineerde kalveren uitscheiding plaatsvinden. <i>M. haemolytica</i> behoort tot de familie <i>Pasteurellaceae</i> en vormt geen overlevingsstructuren zoals sporen. <i>M. haemolytica</i> is sterk aangepast aan de gastheer en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Studies met <i>M. haemolytica</i> Lkt- hebben aangetoond dat de bacterie gedurende 28 dagen na incubatie in aarde of vijverwater niet in aantallen toenam en/of overleefde bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen.	I. Mogelijke gevolgen: De effecten op doel en niet-doel populaties van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.



	De waarschijnlijkheid van het optreden van een schadelijk effect als gevolg van blootstelling aan het GGO verwaarloosbaar klein.	
--	--	--



E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of de deleties leiden tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie in vergelijking met wildtype <i>M. haemolytica</i>. Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn aan de orde geweest in onderdeel D. Daarbij zijn de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op dieren in de omgeving van het proefdier. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel A en D van deze tabel. Wildtype <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 is alleen ziekteverwekkend in runderen. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO (<i>M. haemolytica</i> Lkt-) ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Aangezien de <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 geïsoleerd is uit een kalf, is het onwaarschijnlijk dat deze stam zich vanuit de longen via neus-neus contact kan verspreiden naar mensen en daar ziekte kan veroorzaken. Elk serotype van <i>M. haemolytica</i> is sterk aangepast aan de gastheer en heeft geen eigenschappen om buiten de gastheer langdurig te overleven. De <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals in onderdeel A en D besproken is, is de kans dat het GGO vanuit gevaccineerde kalveren andere mensen kan infecteren en ziekte kan veroorzaken verwaarloosbaar klein.	I. Mogelijke gevolgen: De effecten op menselijke gezondheid van het GGO kunnen groot zijn, als gevolg van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de gastheer, of als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.
F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie		
Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft, en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Er is geen sprake van consumptie. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.	I. Mogelijke gevolgen: Niet van toepassing. II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing. III. Het risico: Niet van toepassing.
G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu		
In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die GGO's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen, of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. <i>M. haemolytica</i> behoort tot de familie <i>Pasteurellaceae</i> en vormt geen overlevingsstructuren zoals	I. Mogelijke gevolgen: De effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu kunnen groot zijn als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, pathogeniteit of persistentie. II. De waarschijnlijkheid:



	sporen. <i>M. haemolytica</i> is sterk aangepast aan de gastheer en kan buiten de gastheer niet goed overleven. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Het is onwaarschijnlijk dat als gevolg van de deletie schadelijke effecten optreden op de microbiële populaties. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Studies met <i>M. haemolytica</i> Lkt- hebben aangetoond dat de bacterie gedurende 28 dagen na incubatie in aarde of vijverwater niet in aantallen toenam en/of overleefde bij een temperatuur van 2-25 graden celsius. Buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen. De kans dat er schadelijke effecten optreden is verwaarloosbaar klein.	De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein.
H. Ongewenste beïnvloeding van biogeochemische processen		
Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op biogeochemische processen ten gevolge van mogelijke directe en indirecte interacties van het GGO en doelwit- en niet-doelwitorganismen in de nabijheid van de GGO-introductie(s). Hieronder wordt verstaan dat het GGO een negatief effect heeft op (micro-) organismen in de bodem die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal. Factoren die een negatief effect kunnen hebben op nutriëntkringlopen of afbraak van organisch materiaal in de bodem zijn bijvoorbeeld toxische stoffen of stoffen die een anti-microbiële werking hebben. De vraag is of de deletie van het gen in <i>M. haemolytica</i> leidt tot anti-microbiële of toxische effecten op de bodem(micro)flora of fauna, waardoor de biogeochemische processen in de bodem kunnen worden beïnvloed.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel G van deze tabel. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO mist het Leukotoxine (Lkt) eiwit dat cytolytisch is voor leukocyten en bloedplaatjes van alleen herkauwers. Het Lkt eiwit zorgt ervoor dat leukocyten op de plaats van infectie vernietigd waardoor de afweer tegen de bacteriële infectie verminderd wordt. Het verwijderde <i>lktA</i> gen is een bewezen virulentiefactor voor <i>P. multocida</i>. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Aangezien het verwijderde gen betrokken is bij de cytolyse van leukocyten en bloedplaatjes van herkauwers en niet betrokken is bij biogeochemische processen, is het onwaarschijnlijk dat biogeochemische processen in de bodem worden beïnvloed.	I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten. II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op biogeochemische processen is verwaarloosbaar klein. III. Het risico: Het risico van negatieve effecten op het bodemleven is verwaarloosbaar klein.



I. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk		
Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de GGO's. Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het GGO kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen. De vraag is of de deletie in het genoom van <i>M. haemolytica</i> zal leiden tot veranderingen in de medische of veterinaire praktijk.	I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De <i>M. haemolytica</i> A1 stam NADC-D153 bezit geen plasmiden waarop antibiotica resistente genen gelegen zijn. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden. Als gevolg van de geïntroduceerde deletie is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Er zijn geen schadelijke effecten op verandering in de medische of veterinaire praktijk te identificeren. II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het GGO is evenals het wildtype gevoelig voor antibiotica. Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.	I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten. II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing. III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.



DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicoanalyse van de voorgestelde introductie van de deletiemutanten *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- uitgevoerd. Potentieel significante risico's zijn die risico's waarvan niet is vastgesteld dat deze risico's geen significante effecten hebben.

Schatting van het risico dat aan de toepassing van alle gedeleteerde sequenties is verbonden	Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's. (Eventuele aanvulling op strategieën die reeds zijn opgenomen in de aanvraag)	Bepaling van het algehele risico van het GGO
Voor de <i>P. multocida delta-hyaE</i> en <i>M. haemolytica</i> Lkt-deletiemutanten is geconcludeerd dat er geen sprake is van een risico voor mens en milieu. Beide GGO's zijn geattenuëerd en kunnen geen ziekte meer veroorzaken. Alleen na intranasale vaccinatie kunnen de GGO's in het milieu terechtkomen, maar ze kunnen zich hier niet handhaven. Ten gevolge hiervan kunnen derden, mensen en andere dieren, aan het GGO worden blootgesteld en kan infectie op voorhand niet worden uitgesloten. De effecten die als gevolg daarvan zullen optreden zijn echter ook dan verwaarloosbaar klein.	Aangezien er geen risico's zijn geconstateerd die groter worden geschat dan verwaarloosbaar klein, is risicomanagement uit oogpunt van milieuveiligheid niet noodzakelijk.	Verwaarloosbaar klein.