



ontwerp beschikking

PorM/RB IM 10-004

Gelezen de aanvraag van Intervet International B.V., te Boxmeer, van 22-09-2010 en de aanvullende informatie van 15-11-2010, 16-11-2010, 17-03-2011, 29-04-2011, en van 31-05-2011, om een vergunning als bedoeld in artikel 23 van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer,

De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu,

overwegende,

1. AANVRAAG¹

De aanvraag heeft betrekking op een veterinaire studie waarin een tweetal genetisch gemodificeerde bacteriën, *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*, worden toegediend aan kalveren voor vaccinatie tegen een *P. multocida* en *M. haemolytica* infectie. De werkzaamheden zijn voorgenomen plaats te vinden in de gemeente Sint Anthonis.

In runderen zijn *P. multocida* en *M. haemolytica* aanwezig in de luchtwegen en het spijsverteringskanaal. Als gevolg van stress, zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kunnen deze bacteriën zich sterk vermenigvuldigen in de longen. Dit kan met name in kalveren leiden tot een chronische of ernstige pneumonie met vaak fatale afloop.

In deze studie wordt een vaccin gebruikt dat als werkzame componenten twee genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) bevat. Het eerste GGO, *P. multocida delta-hyaE*, is gebaseerd op de *P. multocida* wildtype stam NADC-1062 waaruit het gen (*hyaE*) verwijderd is dat codeert voor een enzym dat betrokken is bij de synthese van hyaluronzuur. Door verwijdering van deze bewezen virulentiefactor is de virulentie van het GGO en de overleving in de gastheer verminderd is ten opzichte van wildtype *P. multocida*. Het tweede GGO, *M. haemolytica* Lkt-, is gebaseerd op de *M. haemolytica* A1 wildtype stam NADC-D153 waaruit het *lktA* gen verwijderd is dat codeert voor het leukotoxine. Dit eiwit is cytolytisch voor leukocyten en bloedplaatjes van alleen herkauwers, waartoe runderen behoren. Leukotoxine is een van de belangrijkste virulentie factoren van *M. haemolytica* en speelt een voorname rol in de pathogenese van runder pneumonie pasteurellose. In beide GGO's zijn de betreffende genen met behulp van recombinant DNA technologie verwijderd op een wijze waarbij schone deleties aangebracht worden. Dit houdt in dat er geen coderende vectorsequenties, zoals promotors, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende DNA sequenties, in het genoom van het GGO achterblijven die gebruikt zijn tijdens de constructie van het GGO.

De recombinante bacteriën zullen intranasaal en/of subcutaan aan kalveren worden toegediend. In het lichaam vindt vervolgens interactie plaats met het immuunsysteem. Als gevolg hiervan wordt er immuniteit opgebouwd die de kalveren beschermt tegen infectie met wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica*. Het uiteindelijke doel van de studie is het ontwikkelen van een vaccin tegen *P. multocida* en *M. haemolytica* pneumonie in kalveren.

¹Voor definities van gebruikte begrippen zie artikel 1 van de vergunning.



2. BEOORDELINGSKADER

2.1. Wettelijk kader

Het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer (hierna: het Besluit ggo) vormt het beoordelingskader voor aanvragen om een vergunning als bedoeld in artikel 23, 1^e lid van dit besluit, voor de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen. In het Besluit ggo is de Richtlijn 2001/18/EG inzake “*de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn nr. 90/220/EEG*” (hierna: Richtlijn) geïmplementeerd. Op basis van het besluit moet een ieder die activiteiten wil gaan uitvoeren met genetisch gemodificeerde organismen (hierna: GGO's) die vallen onder introductie in het milieu vooraf een aanvraag indienen waarin een milieurisicoanalyse wordt uitgevoerd van de voorgestelde activiteiten. De uitkomst van de analyse van de mogelijke risico's voor mens en milieu is het toetsingscriterium voor het bevoegd gezag dat de aanvraag beoordeelt. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid, Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

2.2. De aanvraag en beoordeling

De aanvraag moet conform artikel 24, eerste lid Besluit ggo de informatie bevatten als bedoeld in bijlage III, in het bijzonder bijlage IIIA, bij de Richtlijn die nodig is om een milieurisicoanalyse uit te voeren. Daarnaast moet de aanvraag een milieurisicoanalyse bevatten overeenkomstig bijlage II bij de Richtlijn en de bijbehorende Richtsnoer (2002/623/EG). Bij de beoordeling van een aanvraag en de afgifte van een vergunning, kan de Staatssecretaris advies vragen aan de Commissie Genetische Modificatie (hierna: COGEM) over de risico's voor mens en milieu die aan de voorgenomen handelingen met GGO's verbonden kunnen zijn. Na de milieurisicoanalyse kan de Staatssecretaris bij grote mate van wetenschappelijke onzekerheid met betrekking tot de geïdentificeerde risico's, op basis van het voorzorgsbeginsel extra maatregelen aan de beschikking verbinden. Naarmate meer kennis is verkregen over het GGO en de toepassing van het GGO kan eventueel worden overgegaan tot het beperken van de inperkende voorschriften (het stap voor stap principe). De wijze waarop het voorzorgsbeginsel bij de uitvoering van de het Besluit ggo wordt gehanteerd, staat beschreven in de Mededeling van de Europese Commissie over het voorzorgsbeginsel (COM(2000) 1 definitief).

Een aantal van de bovengenoemde begrippen zijn van essentieel belang en behoeven voor een juist begrip een nadere toelichting.

2.3. De milieurisicoanalyse

Bij de milieurisicoanalyse moeten alle mogelijke schadelijke effecten van geïdentificeerde kenmerken van het GGO en het gebruik daarvan, worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme waaruit het GGO is afgeleid en het gebruik daarvan in vergelijkbare situaties. De milieurisicoanalyse moet daarnaast per geval worden uitgevoerd, wat betekent dat de vereiste informatie kan verschillen afhankelijk van het type van het betrokken GGO, het voorgenomen gebruik ervan en de potentiële introductie in het milieu.

Een dergelijke milieurisicoanalyse is gebaseerd op een analyse en beschouwing van de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme en de wijze waarop het GGO wordt toegepast. Daarbij staan twee vragen centraal: 1. Zijn er redenen om aan te nemen dat het genetisch gemodificeerde organisme of zijn nakomelingen vanwege de genetische modificatie schadelijk zal zijn voor mens of milieu? 2. Kan het ingebrachte genetische materiaal van het genetisch gemodificeerde organisme worden overgedragen naar andere organismen, en zijn er redenen om aan te nemen dat die als een resultaat daarvan schadelijk zullen zijn voor mens of milieu?

Deze vragen zijn niet in hun algemeenheid te beantwoorden. Daarom is in de milieurisicoanalyse en de daarop volgende milieurisicobeoordeling een gedetailleerde structuur aangebracht op basis van Bijlage II van de Richtlijn. De gegevens waarop de milieurisicoanalyse is gebaseerd, staan vermeld in Bijlage IIIA van diezelfde richtlijn. De milieurisicoanalyse moet opheldering geven over de aard van de eventuele schadelijke effecten op mens of milieu die worden verwacht als gevolg van de voorgenomen handelingen en een aanduiding van de wijze waarop die effecten zouden kunnen optreden, in vergelijking tot het gehanteerde referentiekader. Hierbij worden zowel directe, indirecte, vertraagde en cumulatieve effecten in beschouwing genomen. Daarbij gaat het niet om het opstellen van een wetenschappelijke verhandeling, maar om een redelijke onderbouwing of bepaalde effecten kunnen optreden.

2.4. Stap voor stap principe

Overweging 24 van de Richtlijn stelt dat “de introductie van GGO's in het milieu stapsgewijs dient plaats te vinden”. Het stap voor stap principe is één van de invullingen van het voorzorgsbeginsel. Het stap voor stap



principe is bedoeld om tijdens de ontwikkeling van GGO's om te kunnen gaan met (a) de mate van onzekerheid die verbonden is aan de milieurisicoanalyse en (b) mogelijke onvoorziene effecten van het GGO. Tijdens het doorlopen van opeenvolgende stappen in het ontwikkelingsproces komt meer informatie beschikbaar en nemen de onzekerheden in de milieurisicoanalyse af. Onzekerheden kunnen leiden tot het verbinden van extra voorschriften aan de vergunning. Daarna kan bij afnemende onzekerheid en als de milieurisicoanalyse dit toelaat, het aantal voorschriften ter inperking van het risico verminderd worden.

2.5. Voorzorgsbeginsel

In het geval dat er onvoldoende wetenschappelijke zekerheid bestaat met betrekking tot de uitkomst van de milieurisicoanalyse en een worst case scenario conform het voorzichtigheidsbeginsel hiervoor geen oplossing biedt, kunnen op basis van het voorzorgsbeginsel extra maatregelen door de Staatssecretaris worden opgelegd. Daarbij staat voorop dat de maatregelen proportioneel dienen te zijn ten opzichte van het risico dat is gesignaleerd en het gewenste veiligheidsniveau. Het voorzorgsbeginsel heeft in het kader van het Besluit ggo met name daar zijn functie waar onzekerheden worden aangetroffen die nieuw zijn in vergelijking met de maatschappelijk reeds geaccepteerde risico's. Indien het vermoeden bestaat dat er potentieel schadelijke effecten op kunnen treden die van de gangbare praktijk afwijken kan het voorzorgsbeginsel worden gehanteerd en de werkzaamheden (a) worden ingeperkt met passende aanvullende voorschriften of (b) worden geweigerd.

3. PROCEDURE

De aanvraag is ontvangen d.d. 23-09-2010. De aanvraag en de aanvullende informatie zijn getoetst aan de vereisten zoals genoemd in artikel 24 van het Besluit ggo en voldoen daaraan. Een deel van aanvullende informatie van 17-03-2011 is door de aanvrager als vertrouwelijk gekenmerkt. Op grond van Artikel 25, tweede lid, van Richtlijn 2001/18 in samenhang met artikel 19.3 van de Wet milieubeheer en artikel 10 van de Wet openbaarheid van bestuur, heeft de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu ingestemd met het verzoek van de aanvrager om de aanvullende informatie van 17-03-2011 vertrouwelijk te behandelen. Op 22-09-2010 heeft de aanvrager al een openbare samenvatting van deze vertrouwelijke informatie geleverd waaruit de risicoanalyse navolgbaar is.

De aanvraag is behandeld conform het bepaalde in de uniforme openbare voorbereidingsprocedure in afdeling 3.4 van de Algemene wet bestuursrecht, afdeling 13.2 van de Wet milieubeheer en artikel 24 van het Besluit ggo.

Tussen de ministeries betrokken bij de vergunningverlening van genetisch gemodificeerde organismen met betrekking tot risico's voor mens en milieu; het ministerie van IenM, EL&I en VWS, zijn procedurele afspraken gemaakt over het tijdstip van advisering door de COGEM. Deze afspraken houden mede in dat advisering door de COGEM over de mogelijke risico's voor mens en milieu van de aangevraagde werkzaamheden zal plaatsvinden op basis van de aanvraag en de door de Staatssecretaris van IenM opgestelde ontwerpbeslissing.

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

Conform Bijlage II van de Richtlijn moet bij de milieurisicoanalyse rekening gehouden worden met de relevante technische en wetenschappelijke details betreffende de informatievereisten zoals genoemd in Bijlage III en in het bijzonder Bijlage IIIA. Een samenvatting van deze gegevens van Bijlage IIIA, zoals die door de aanvrager in zijn aanvraag zijn aangeleverd, is hieronder weergegeven.

4.1. Gastheerorganismen (*Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*)

Algemeen:

Wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica* behoren tot de familie *Pasteurellaceae* en komen wereldwijd voor in verscheidene dieren. Elk serotype is sterk aangepast aan zijn eigen specifieke gastheer en transmissie van deze bacterie naar andere gastheersoorten komt niet veel voor. Runderen zijn de gastheer voor de *P. multocida* serotype A stam NADC-1062. Wildtype *M. haemolytica* biotype A, serotype 1 (*M. haemolytica* A1) heeft uitsluitend herkauwers, waaronder runderen, als gastheer. In gezonde runderen zijn beide bacteriën aanwezig in het respiratoire- en spijsverteringskanaal en veroorzaken doorgaans geen ziekte.

Infectie, replicatie en uitscheiding

Als gevolg van stress, zoals sterke veranderingen van temperatuur of omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen, kunnen de bacteriën zich sterk vermenigvuldigen in de longen. Zonder behandeling kan hierdoor een chronische of ernstige pneumonie veroorzaakt worden, vaak met fatale afloop. Systemische infectie komt in gezonde dieren niet voor. Zowel de *P. multocida* stam



NADC-1062 als de *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153, die gebruikt zijn voor de constructie van het GGO, zijn geïsoleerd uit de longen van kalveren die overleden zijn aan pneumonie.

Overdracht van de *P. multocida* en *M. haemolytica* bacteriën tussen runderen vindt voornamelijk plaats vanuit de longen via neus-neus transmissie. Zowel *P. multocida* en *M. haemolytica* kunnen buiten de gastheer niet goed overleven en vormen geen overlevingsstructuren zoals sporen. Er zijn geen andere niches buiten de gastheer bekend. Beide bacteriën bezitten geen plasmiden waarop antibiotica resistentie genen gelegen zijn. Een eventuele infectie met deze bacteriën kan in de meeste gevallen adequaat met antibiotica behandeld worden.

4.2. De deleties

Uit de wildtype *P. multocida* stam NADC-1062 is het *hyaE* gen verwijderd om de recombinante vaccinstam te verkrijgen. Het verwijderde gen codeert voor een eiwit dat betrokken is bij de synthese van hyaluronzuur. 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. Uit de wildtype *M. haemolytica* stam NADC-D153 is het *lktA* gen verwijderd dat codeert voor het leukotoxine (Lkt) eiwit. Dit eiwit is cytolytisch voor leukocyten en bloedplaatjes 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. De verwijderde *hyaE* en *lktA* genen spelen geen rol in de gastheerspecificiteit.

4.3. De GGO's

Constructie

De GGO's zijn met een techniek geconstrueerd die geen vectorsequenties, zoals promoters, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende DNA sequenties, achter laat in het organisme.

De *P. multocida* deletiemutant is op de volgende wijze verkregen. Via recombinant DNA technologie is een *hyaE* genfragment gemaakt waarbij een gedeelte van de sequentie verwijderd is en vervangen door linkers van in totaal 24 basenparen. Een vector met daarin het gemodificeerde *hyaE* genfragment en een kanamycine resistentiegen 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 temperatuurgevoelige vector met het antibioticum resistentiegen opgenomen hebben. Door vervolgens bij een temperatuur van 40 graden celsius te kweken worden 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 kunnen alleen die bacteriën (*P. multocida delta-hyaE*) geselecteerd worden die geen vectorsequenties in zich hebben, maar alleen het gemodificeerde *hyaE* genfragment.

Op een vergelijkbare wijze is de *M. haemolytica* deletiemutant geconstrueerd. Via recombinant DNA technologie is een *lktA* genfragment gemaakt waarbij een deel van de sequentie verantwoordelijk voor de de cytolytische activiteit verwijderd is. Een temperatuurgevoelige vector met daarin het gemodificeerde *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. Bacteriën (*M. haemolytica* Lkt-) die geen vectorsequenties in zich dragen, maar alleen het gemuteerde *lktA* genfragment, kunnen geselecteerd worden door te kweken zonder kanamycine selectie onder normale temperatuur.

Virulentie en stabiliteit

De *P. multocida delta-hyaE* stam mist een eiwit voor de synthese van hyaluron acid en heeft daardoor een kapselloos fenotype. Het GGO kan daardoor veel makkelijker door het immuunsysteem worden vernietigd. De *M. haemolytica* Lkt- bacterie is niet meer in staat om leukotoxine te produceren. Leukotoxine speelt een belangrijke rol in de pathogenese van runder pneumonie pasteurellose.

Zowel het *hyaE* als het *lktA* gen zijn een van de belangrijkste virulentie factoren van respectievelijk *P. multocida* en *M. haemolytica*. Door het uitschakelen van deze genen is de virulentie van beide GGO's en de overleving in de gastheer verminderd ten opzichte van de wildtype bacterie. De vaccinstammen kunnen wel nog immuniteit opleveren tegen de bacteriën *P. multocida* en *M. haemolytica*.

4.4. Beschrijving van het onderzoek

Het onderzoek zal plaatsvinden op de locatie van Intervet in de gemeente Sint Anthonis. Er zullen in totaal maximaal 4000 kalveren gevaccineerd worden. De *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt-



deletiemutanten worden subcutaan en/of intranasaal toegediend aan kalveren van 1 week en ouder. De dosis varieert van 10^5 tot 10^{11} CFU (kolonievormende eenheden) per dosis, welke toegediend wordt in maximaal vier doseringen met een interval van maximaal vier weken. 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. Afhankelijk van het doel van ieder experiment zal er een challenge plaatsvinden met wildtype bacteriën. De kalveren worden gehouden in stallen of dubbel afgerasterde weilanden. Gedurende de proef komen de gevaccineerde kalveren niet in direct contact met dieren die geen deel uitmaken van het experiment. Alle proeven worden beëindigd met een post-mortem onderzoek.

4.5. Productie, vervoer, bemonstering en afvalbehandeling

Productie

Productie van de deletiemutanten vindt plaats bij Intervet te Boxmeer en maakt geen deel uit van de onderhavige aanvraag en beschikking. De productie vindt plaats onder vergunning IG 94-024. De bacteriën worden gekweekt in vloeibaar medium en 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 deleties. Tevens wordt een determinatie analyse toegepast om aan te tonen dat er in de batches de juiste *P. multocida* en *M. haemolytica* bacteriën zitten.

Monstername en analyse

Monstername maakt deel uit van de onderhavige aanvraag en beschikking. Van de proefdieren worden bloedmonsters en neusswabs afgenomen. De kans dat in bloedmonsters de GGO vaccinstammen zitten is heel erg klein na zowel subcutane als na intranasale vaccinatie. Ook voor neusswabs is de kans zeer klein dat hierin na subcutane vaccinatie GGO's zitten. Na intranasale vaccinatie is de kans echter reëel de neusswabs GGO's bevatten (zie hoofdstuk 5). Analyse van de monsters vindt plaats onder vergunning IG 94-024.

Afval en besmet materiaal

Afval zal voornamelijk bestaan uit stro en mest dat zal worden afgevoerd onder normale omstandigheden zoals die gelden in de veehouderij. Mest kan op het land worden uitgereden en er worden geen maatregelen genomen om verspreiding van de vaccinstam tegen te gaan. Alle kadavers zullen worden aangeboden aan een destructiebedrijf als categorie 1 materiaal, uitsluitend geschikt voor vernietiging.

4.6. Interactie met het milieu

De GGO's die in deze studie aan kalveren toegediend worden zijn gebaseerd op de wildtype *P. multocida* stam NADC-1062 en *M. haemolytica* stam NADC-D153. De verwijderde *hyaE* als *lktA* genen behoren tot de belangrijkste virulentie factoren van respectievelijk *P. multocida* en *M. haemolytica*. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de GGO's ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. Kalveren worden subcutaan en/of intranasaal gevaccineerd waardoor de vaccinstammen in het milieu terecht kunnen komen. Buiten de gastheer in het milieu kunnen de bacteriën niet goed overleven. Er zijn geen andere niches voor deze bacteriestammen buiten de gastheer bekend. Hoewel het milieu blootgesteld kan worden aan het GGO zal de bacterie buiten de gastheer beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen.

5. MILIEURISICOANALYSE

De milieurisicoanalyse is een technisch-wetenschappelijk werkproces waarbij de mogelijke risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu die verbonden zijn aan de werkzaamheden inzichtelijk worden gemaakt. Deze technisch-wetenschappelijke milieurisicoanalyse is gedetailleerd beschreven in het werkdocument "Milieurisicoanalyse behorend bij aanvraag IM 10-004". Het werkdocument is openbaar en wordt ter inzage gelegd bij de (ontwerp)beschikking.

Bij de milieurisicoanalyse van de onderhavige aanvraag zijn alle punten van bijlage III van de Richtlijn beschouwd. Alleen de voor de onderhavige aanvraag relevante aspecten zijn daarna in de beoordeling betrokken. De technisch-wetenschappelijke milieurisicoanalyse is onder verantwoordelijkheid van het Ministerie van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer uitgevoerd. Bij de analyse van de mogelijke risico's is de methodiek gevolgd zoals beschreven in bijlage II van de Richtlijn en de bijbehorende Richtsnoer (2002/623/EG).

Hieronder is deze wetenschappelijk technische milieurisicoanalyse samengevat, waarbij alleen de voor de onderhavige aanvraag relevante aspecten zijn beschreven.



5.1. Algemeen

In de gebruikte *P. multocida* en *M. haemolytica* deletiemutanten zijn respectievelijk het *hyaE* en *lktA* gen verwijderd. Het doel van de genetisch gemodificeerde bacteriestammen in de onderhavige aanvraag is om kalveren tegen een *P. multocida* en *M. haemolytica* infectie te vaccineren. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties kunnen de vaccinstammen ten opzichte van de wildtype bacteriën minder goed overleven in de gastheer. Daarmee is de virulentie van beide GGO's sterk verminderd, waardoor de genetisch gemodificeerde bacteriën hun ziekteverwekkende vermogen verloren hebben. Na vaccinatie kunnen de vaccinstammen uitgescheiden worden waardoor het milieu blootgesteld wordt aan de GGO's. In de milieurisicoanalyse wordt beoordeeld of en hoe derden blootgesteld kunnen worden aan de GGO's en of vervolgens infectie van derden op kan treden. Daarnaast wordt ook in beschouwing genomen welke schadelijke effecten op kunnen treden als het milieu, waaronder mensen, dieren en micro-organismen, in aanraking komt met de GGO's. Bij de beoordeling wordt uitgegaan van het feit dat beide uitgangorganismen, *P. multocida* en *M. haemolytica*, wereldwijd voor kunnen komen in het respiratoire- en spijsverteringskanaal van runderen. De bacteriën zijn alleen pathogeen bij stress situaties, zoals sterke veranderingen van temperatuur, omgeving van het dier, transport van het dier, of door infecties met andere micro-organismen.

5.2. De GGO's

Persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen

Elk serotype van *P. multocida* en *M. haemolytica* is sterk aangepast aan zijn eigen specifieke gastheer en transmissie van de bacterie naar andere gastheersoorten komt niet veel voor. Zowel de *P. multocida* stam NADC-1062 als de *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153, die gebruikt zijn voor de constructie van de GGO's, zijn geïsoleerd uit de longen van kalveren die overleden zijn aan pneumonie. Overdracht tussen runderen vindt voornamelijk plaats vanuit de longen via neus-neus transmissie. Beide bacteriën kunnen buiten hun gastheer niet goed overleven en vormen geen overlevingsstructuren zoals sporen. Daarbij zijn er geen andere niches buiten de gastheer bekend. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- stammen ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen zij niet goed meer overleven in de gastheer. Zowel het *hyaE* als het *lktA* gen zijn een van de belangrijkste virulentie factoren van respectievelijk *P. multocida* en *M. haemolytica*. De gastheerspecificiteit van de GGO's is niet gewijzigd aangezien de verwijderde genen hierin geen rol spelen.

De GGO's worden subcutaan en/of intranasaal toegediend aan kalveren. Hierdoor is er een reële kans dat de GGO's na vaccinatie in het milieu terecht kunnen komen. Overlevingstesten 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. Studies met *M. haemolytica* Lkt- hebben aangetoond 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.

Genoverdracht en complementatie

De verloren functies van de GGO's kunnen in theorie worden teruggebracht door DNA uitwisseling met de wildtype bacteriën die de ontbrekende genen in het genoom hebben. Beide GGO's zijn 'schone' deletiemutanten, dat wil zeggen dat er geen 'vreemde' coderende DNA sequenties in het genoom achtergebleven zijn bij het creëren van de deletiemutanten. De kans op uitwisseling van de deleties is aanwezig, aangezien alle kalveren in principe drager zijn van wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica*. Eventuele homologe recombinatie tussen de vaccinstam *P. multocida delta-hyaE* en wildtype *P. multocida*, en tussen *M. haemolytica* Lkt- en wildtype *M. haemolytica*, zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Aan een dergelijke uitwisseling is als enige gevolg verbonden dat er een stam ontstaat die identiek is aan de wildtype bacteriën.

De aanwezige verzwakte wildtype virussen BRSV, Pi3 virus en/of BHV in het vaccin bezitten geen genen die de deleties in beide GGO's kunnen complementeren. Daarbij bevatten de virussen geen DNA dat kan coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de biosynthese van het kapsel van *P. multocida* of het leukotoxine van *M. haemolytica*.

5.3. Mogelijk schadelijke effecten van de GGO's en de evaluatie van de mogelijke gevolgen van deze effecten

Wildtype *P. multocida* NADC-1062 en *M. haemolytica* NADC-D153 zijn alleen ziekteverwekkend in runderen als gevolg van stress. Sterke veranderingen van temperatuur of omgeving van het dier, transport van het dier, of infecties met andere micro-organismen, kunnen tot gevolg hebben dat de bacteriën zich sterk vermenigvuldigen in de longen. Zonder behandeling kan hierdoor een chronische of ernstige



pneumonie veroorzaakt worden met vaak fatale afloop. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. De vaccinstammen hebben hun ziekteverwekkende vermogen verloren, maar kunnen nog wel immuniteit opwekken tegen *P. multocida* en *M. haemolytica*.

Subcutane vaccinatie

Ten gevolge van de deleties kunnen de GGO's niet meer goed overleven in de gastheer. Uit eerder onderzoek blijkt dat de vaccinstammen na subcutane toediening tijdelijk aanwezig blijven op de injectieplaats en dat ze vervolgens worden opgeruimd door het afweersysteem. Een subcutane vaccinatiestudie in de nek van kalveren heeft aangetoond dat beide GGO's op de plaats van injectie blijven of migreren 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 *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- is aangetoond dat het vaccin veilig te gebruiken is in 4-8 weken oude kalveren. Er zijn in deze studie geen nadelige effecten gerapporteerd.

Een subcutane vaccinatie studie 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 echter geen indicaties van verspreiding van het GGO naar het milieu. Een andere subcutane vaccinatie studie in kalveren met een dosis van $7,4 \times 10^9$ CFU van *M. haemolytica* Lkt- of een combinatie van beide GGO's ($2,0 \times 10^7$ CFU *P. multocida delta-hyaE* en $2,2 \times 10^8$ CFU *M. haemolytica* Lkt-) toont aan dat de bacteriën op de injectieplaats blijven en niet naar de longen migreren. In beide studies is het vrijkomen van het vaccin vanuit de subcutaan gevaccineerde dieren niet waargenomen. Uit neus swabs van subcutaan gevaccineerde kalveren konden geen GGO's geïsoleerd worden en er trad geen seroconversie op in contact controle kalveren. Een subcutane vaccinatie leidt niet tot uitscheiding van het vaccin.

Intranasale vaccinatie

Na intranasale toediening van de GGO's aan kalveren kunnen de vaccinstammen worden uitgescheiden in het milieu. De vaccinstam *M. haemolytica* Lkt- kon na intranasale vaccinatie voor tenminste 22 dagen worden uitgescheiden. De GGO's blijven enige tijd aanwezig in de bovenste luchtwegen en kunnen daarmee via niezen en/of neuscontact uitgescheiden worden in het milieu waarbij overdracht van de GGO's naar andere dieren via neus-neus transmissie mogelijk is. Ook na intranasale vaccinatie zijn geen schadelijke klinische effecten in kalveren waargenomen. Daarbij kan worden aangetekend dat wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica* aanwezig zijn in het respiratoire- en spijsverteringskanaal van runderen en dat andere dieren of mensen voortdurend hieraan blootgesteld kunnen worden.

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. Dit betekent dat de vaccinstam veel minder virulent is dan de wildtype stam. 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. 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. Aangezien de *P. multocida* stam NADC-1062 geïsoleerd is uit een kalf, is het onwaarschijnlijk dat deze stam of de deletiemutant *P. multocida delta-hyaE* zich vanuit de longen via neus-neus contact kan verspreiden naar mensen en daar ziekte kan veroorzaken.

De LD50 waarde voor *M. haemolytica* Lkt- is een factor 5,4 hoger in vergelijking met de wildtype ouderstam zoals aangetoond in een intraperitoneale vaccinatie studie in muizen. Een andere gemuteerde *M. haemolytica* stam S9B0071 die geen detecteerbaar leukotoxine produceert heeft een verminderde virulentie in zowel geiten als runderen in vergelijking met de wildtype 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 wildtype stam. In een intranasale vaccinatie studie in schapen met een dosis van $4,8 \times 10^9$ CFU met *M. haemolytica* Lkt- zijn geen klinische effecten waargenomen. Ook het post-mortem onderzoek leverde geen aanwijzingen voor nadelige effecten van de studie voor de gevaccineerde dieren.

Buiten de gastheer in het milieu zijn de overlevingsmogelijkheden van de vaccinstammen sterk verminderd. Daarbij zijn er geen andere niches van *P. multocida* en *M. haemolytica* buiten de gastheer bekend. In het



milieu buiten de gastheer zal de bacterie beperkte tijd overleven, waardoor het organisme op den duur uit het milieu zal verdwijnen. Gezien de functie van de verwijderde genen is het daarbij onwaarschijnlijk dat als gevolg van de deleties schadelijke effecten optreden op microbiële populaties in het milieu.

5.4. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijk effect

Vanuit subcutaan gevaccineerde kalveren kunnen de genetisch gemodificeerde bacteriën niet in het milieu terecht komen. De bacteriën blijven tijdelijk aanwezig op de injectieplaats en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam. Een subcutane vaccinatie leidt niet tot uitscheiding en is daarmee een doodlopende weg voor het vaccin. Bij intranasale toediening is de kans aanwezig dat de GGO's uitgescheiden worden en in het milieu terecht komen waardoor andere dieren of mensen geïnfecteerd zouden kunnen raken. Daarnaast kunnen de vaccinstammen in het milieu terecht komen tijdens de toediening bij accidentele breuk van de batch of morsen.

Elk serotype van *P. multocida* en *M. haemolytica* is sterk aangepast aan zijn eigen specifieke gastheer en de bacteriën hebben geen eigenschappen om buiten de gastheer langdurig te overleven. Overlevingstesten 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. Studies met *M. haemolytica* 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.

Transmissie van zowel *P. multocida* en *M. haemolytica* naar andere gastheersoorten komt niet veel voor. Zowel de *P. multocida* stam NADC-1062 als de *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153, die gebruikt zijn voor de constructie van de GGO's, zijn geïsoleerd uit de longen van kalveren die overleden zijn aan pneumonie. Buiten de gastheer zijn er geen andere niches bekend. Daarbij zal de dosis waaraan andere dieren of mensen worden blootgesteld vele malen lager zijn dan de gebruikte dosis voor de vaccinatie van de kalveren. De kans dat de GGO's zich in andere gastheren dan runderen kan handhaven en ziekte kan veroorzaken is onwaarschijnlijk. Daarnaast betreft het hier vaccinstammen die vanwege de deleties hun ziekteverwekkende vermogen verloren hebben en ook niet in staat zijn om schadelijke effecten te veroorzaken in andere dieren. De kans dat andere dieren of mensen blootgesteld worden aan de GGO's én dat daardoor een schadelijk effect optreedt kan beschouwd worden als verwaarloosbaar klein zowel na subcutane als intranasale toediening.

Geconcludeerd kan worden dat de waarschijnlijkheid van het optreden van mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

5.5. Schatting van het risico van de GGO's

In de bovenstaande overwegingen wordt geconcludeerd dat, voor de gebruikte genetisch gemodificeerde *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- bacteriën, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De kans op verspreiding van de GGO's in het milieu is alleen aanwezig na intranasale toediening waarbij derden blootgesteld kunnen worden aan de GGO's. De schadelijke effecten die als gevolg hiervan mogelijk kunnen optreden zullen echter ten opzichte van het wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica* verwaarloosbaar klein zijn. Derhalve kan geconcludeerd worden dat met de introductie van de genetisch gemodificeerde *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- vaccinstammen de milieurisico's verwaarloosbaar klein zullen zijn.

5.6. Maatregelen voor risicobeheer

Aangezien de milieurisico's van de toepassing van genetisch gemodificeerde *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- vaccinstammen verwaarloosbaar klein zijn, is het voorschrijven van risicobeheersmaatregelen uit oogpunt van de veiligheid voor mens en milieu niet noodzakelijk. Stro en mest kunnen zonder additionele maatregelen op het land worden uitgereden, aangezien de risico's voor mens en milieu van de vaccinstammen verwaarloosbaar klein zijn.



6. CONCLUSIES VAN MOGELIJKE MILIEUEFFECTEN VAN DE INTRODUCTIE

In Bijlage II, onder D1 van de Richtlijn wordt een aantal punten opgesomd die, waar passend, dienen als basis voor de conclusies over de mogelijke milieueffecten van de voorgenomen introductie van de GGO's in het milieu. Voor de volledigheid van de risicoanalyse worden al deze punten hieronder opgesomd voor de in deze vergunning aangevraagde werkzaamheden, met hun bijbehorende conclusies.

1. Waarschijnlijkheid dat de GGO's in natuurlijke habitats persistent en invasief worden onder omstandigheden van de voorgestelde introductie

De waarschijnlijkheid dat de GGO's persistent en invasief wordt is verwaarloosbaar klein, omdat de genetische modificatie niet zal leiden tot het ontstaan van GGO's die zelf persistente of invasieve eigenschappen hebben. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. Ook buiten hun gastheer kunnen beide bacteriën niet goed overleven en er zijn geen andere niches bekend. Het risico dat de GGO's in natuurlijke habitats persistent en invasief worden onder omstandigheden van de voorgestelde introductie is verwaarloosbaar klein.

2. Selectieve voordelen of nadelen die op de GGO's zijn overgedragen en de waarschijnlijkheid dat zulks geschiedt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie

De waarschijnlijkheid van een verhoogd selectief voordeel bij toepassing van de GGO's is verwaarloosbaar klein. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen zij niet goed meer overleven in de gastheer. Ook buiten hun gastheer kunnen beide bacteriestammen niet goed overleven en er zijn geen andere niches bekend. Hierdoor hebben de GGO's een selectief nadeel ten opzichte van hun wildtype stammen. De risico's voor mens en milieu van de gebruikte genetisch gemodificeerde bacteriën zijn verwaarloosbaar klein.

3. Kans op overdracht op andere soorten onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie van de GGO's en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten kunnen worden overgedragen

De waarschijnlijkheid van genetische overdracht van de sequenties naar andere bacteriesoorten bij toepassing van de GGO's is aanwezig, maar de gevolgen hiervan zijn verwaarloosbaar klein omdat beide GGO's 'schone' deletiemutanten zijn. In de GGO's zijn geen coderende vectorsequenties, zoals promotors, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende DNA sequenties meer aanwezig. Aan een eventuele recombinatie tussen de vaccinstam *P. multocida delta-hyaE* en wildtype *P. multocida*, en tussen *M. haemolytica* Lkt- en wildtype *M. haemolytica*, is als enige gevolg verbonden dat er een stam ontstaat die identiek is aan de wildtype bacteriën. De kans op transmissie van de erfelijke eigenschappen naar andere bacteriën en de mogelijke schadelijke effecten hiervan is verwaarloosbaar klein.

4. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen de GGO's en het proefdier, en tussen de GGO's en niet-doelwitorganismen

De waarschijnlijkheid van milieueffecten op doelwitorganismen bij toepassing van het GGO is verwaarloosbaar klein. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. Niet alleen in kalveren, maar ook in andere dieren, waaronder muizen, konijnen, kippen en schapen, kunnen de GGO's geen ziekte veroorzaken. Buiten hun gastheer kunnen beide bacteriën niet goed overleven en er zijn geen andere niches bekend. Het is onwaarschijnlijk dat als gevolg van de deleties schadelijke milieueffecten optreden op microbiële populaties in het milieu.

5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen de GGO's en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van GGO-introductie

De waarschijnlijkheid van effecten op menselijke gezondheid bij toepassing van de GGO's is verwaarloosbaar klein, omdat de genetische modificaties niet zullen leiden tot het ontstaan van GGO's die zelf nadelige effecten op de menselijke gezondheid teweegbrengen. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. Ook buiten hun gastheer kunnen beide bacteriën niet goed overleven en er zijn geen andere



niches bekend. De risico's voor mens en milieu van de gebruikte genetisch gemodificeerde bacteriën zijn verwaarloosbaar klein.

6. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de gezondheid van dieren en effecten op de voeder/voedselketen van consumptie van de GGO's en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder bestemd zijn.

De GGO's zullen niet in de voeder/voedselketen opgenomen worden, maar zullen wel subcutaan en/of intranasaal aan kalveren toegediend worden. De waarschijnlijkheid van effecten op menselijke of diergezondheid bij toepassing van de GGO's is verwaarloosbaar klein, omdat de genetische modificaties niet zullen leiden tot het ontstaan van GGO's die zelf nadelige effecten teweegbrengen. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in de gastheer. Ook buiten hun gastheer kunnen beide bacteriën niet goed overleven en er zijn geen andere niches bekend. De risico's van de gebruikte genetisch gemodificeerde bacteriën op de gezondheid van dieren zijn verwaarloosbaar klein. Consumptie van de GGO's en alle daarvan afgeleide producten is niet van toepassing omdat alle proeven worden beëindigd met een post-mortem onderzoek en de kadavers allen vernietigd zullen worden.

7. Mogelijke verandering in de staande medische of veterinaire praktijk

De waarschijnlijkheid van verandering in de staande medische of veterinaire praktijk bij toepassing van de GGO's is verwaarloosbaar klein, omdat de genetische modificatie niet zal leiden tot het ontstaan van GGO's die zelf schadelijke invloed hebben op de staande medische praktijk. Beide GGO's zijn 'schone' deletiemutanten, dat wil zeggen dat er geen coderende vectorsequenties, zoals promoters, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende DNA sequenties, in het genoom van het GGO achterblijven zijn, die gebruikt zijn tijdens de constructie van het GGO.

7. ADVIES

De COGEM zal gelijktijdig met de publicatie van de onderhavige ontwerpbeschikking om advies worden gevraagd.

8. CONCLUSIE

Het doel van de veterinaire studie is het ontwikkelen van een vaccin tegen *P. multocida* en *M. haemolytica* pneumonie in kalveren. De genetisch gemodificeerde stammen zijn gegenereerd door in de wildtype *P. multocida* stam NADC-1062 het *hyaE* gen en in de wildtype *M. haemolytica* A1 stam NADC-D153 het *lktA* gen te verwijderen. Beide genen zijn belangrijke virulentiefactoren. De GGO's zijn 'schone' deletiemutanten, dat wil zeggen dat er geen coderende vectorsequenties, zoals promoters, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende DNA sequenties, in het genoom van het GGO meer aanwezig zijn. Als gevolg van de deleties zijn de *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- deletiemutanten ten opzichte van de wildtype stammen sterk geattenuëerd en kunnen niet goed meer overleven in runderen. Ook buiten hun gastheer kunnen beide bacteriën niet goed overleven en er zijn geen andere niches bekend. De kans op verspreiding van de GGO's in het milieu is alleen aanwezig na intranasale toediening waarbij derden blootgesteld kunnen worden aan de GGO's. De schadelijke effecten die als gevolg hiervan kunnen optreden zullen echter ten opzichte van wildtype *P. multocida* en *M. haemolytica* verwaarloosbaar klein zijn. Concluderend kan gesteld worden dat het risico voor mens en milieu bij toepassing van de genetisch gemodificeerde *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- bacteriën verwaarloosbaar klein is.

Uit de milieurisicoanalyse blijkt aan de aangevraagde werkzaamheden, als deze onder de voorwaarden zoals aangevraagd worden uitgevoerd, geen mogelijke effecten verbonden te zijn die onaanvaardbaar zijn voor mens en milieu. De aanvraag voldoet daarmee aan de bepalingen van het Besluit GGO en de Richtlijn. Er zijn op basis van artikel 9.2.2.3, tweede lid van de Wet milieubeheer dan ook geen redenen om de aangevraagde werkzaamheden te weigeren.



Naar aanleiding van deze overwegingen, gelet op het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer alsmede op de Wet milieubeheer,

B E S L U I T:

- I Aan Intervet International B.V. te Boxmeer een vergunning te verlenen als bedoeld in artikel 23 van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer.
- II Aan de vergunning, waarvan de op 23-09-2010 ingediende vergunningaanvraag en de daarbij behorende stukken deel uitmaken, worden de hierna volgende voorschriften verbonden:

Artikel 1. Definities en begrippen

In deze vergunning wordt, voor zover van toepassing, verstaan onder:

- a. Besluit: Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer;
- b. COGEM: commissie genetische modificatie, ingesteld bij de Wet milieubeheer;
- c. Staatssecretaris: Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu, p.a. Directie Risicobeleid, ic 655, Postbus 30945, 2500 GX Den Haag.
- d. *hyaE*: gen dat codeert voor een enzym dat betrokken is bij de synthese van hyaluronzuur
- e. *lktA*: gen dat codeert voor het leukotoxine welke cytolytisch is voor leukocyten en bloedplaatjes van alleen herkauwers.
- f. CFU: kolonievormende eenheden

Artikel 2. Toegestane werkzaamheden

1. De onderhavige vergunning heeft uitsluitend betrekking op de in de aanvraag beschreven werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde *P. multocida delta-hyaE* en *M. haemolytica* Lkt-bacteriën, in de gemeente Sint Anthonis.
2. Jaarlijks mogen werkzaamheden als bedoeld in het eerste lid uitsluitend doorgang vinden:
 - a. nadat aan de Staatssecretaris het verslag als bedoeld in Artikel 6, vierde lid, is gezonden; deze bepaling geldt niet voor de eerste keer dat werkzaamheden als bedoeld in het eerste lid worden uitgevoerd;
 - b. voor zover die werkzaamheden zijn beschreven in de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden als bedoeld in Artikel 4 en voorzover er minstens 15 dagen zijn verstreken nadat die beschrijving conform Artikel 4 aan de Staatssecretaris is gezonden, of zodra de ontvangst van de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden schriftelijk is bevestigd.

Artikel 3. Algemene voorschriften

1. De vergunninghouder dient tijdens de uitvoering van de werkzaamheden als bedoeld in Artikel 2 zich te verzekeren van de volledige zeggenschap over de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen. Daartoe dient voor aanvang van de werkzaamheden in het logboek, als bedoeld in Artikel 6, eerste lid, te worden vastgelegd op welke wijze de zeggenschap wordt gegarandeerd.
2. Medewerkers die uit hoofde van hun functie betrokken zijn bij de werkzaamheden, als bedoeld in Artikel 2 dienen op de hoogte te zijn van de bepalingen in deze vergunning en de invulling daarvan. Hiertoe dient een instructie te worden opgesteld die aan de bij de werkzaamheden betrokken personen ter beschikking wordt gesteld en bij het logboek, als bedoeld in Artikel 6, eerste lid, wordt gevoegd.
3. Voor het interne toezicht op de vergunning worden één of meer milieuveiligheidsfunctionarissen aangesteld die door de Staatssecretaris van IenM zijn toegelaten. Deze functionarissen zijn deskundig met betrekking tot de werkzaamheden waarvoor deze vergunning is verleend.

Artikel 4. Voorschriften met betrekking tot de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden

1. De vergunninghouder is verplicht voor de aanvang van de werkzaamheden een beschrijving van de voorgenomen werkzaamheden aangetekend te zenden aan de Staatssecretaris.
2. Voor het maken van een beschrijving van voorgenomen werkzaamheden als bedoeld in het eerste lid, dient tenminste het bij deze vergunning gevoegde formulier 'beschrijving van voorgenomen werkzaamheden' volledig en naar waarheid te worden ingevuld, waarbij in ieder geval vermeld dient te



worden op welke datum en op welke locatie de werkzaamheden van start gaan en hoeveel dieren worden geïncubeerd.

Artikel 5. Voorschriften met betrekking tot controle

1. Iedere wijziging van gegevens met betrekking tot de vergunningaanvraag of de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden, moeten in het logboek worden opgenomen en onverwijld schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld. Tot wijzigingen van gegevens behoren in ieder geval:
 - wijziging (in de naamgeving) van de rechtspersoon zoals vermeld in de aanvraag,
 - wijziging van contactpersoon, of
 - wijziging van milieuveiligheidsfunctionaris
2. Gedurende het uitvoeren van de in Artikel 2, eerste lid, bedoelde werkzaamheden moet regelmatig en doelmatig op locatie gecontroleerd worden op afwijkingen ten opzichte van de gegevens in de onderliggende aanvraag. Deze afwijkingen dienen te worden genoteerd in een logboek, als bedoeld in Artikel 6, eerste lid.
3. Afwijkingen van de werkzaamheden, zoals bedoeld in het tweede lid, die van invloed kunnen zijn op de risico's voor mens en milieu, dienen onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Staatssecretaris gemeld te worden.
4. Iedere onvoorziene omstandigheid die de werkzaamheden betreft zoals beschreven in Artikel 2, eerste lid, moet onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld.
5. Bij een schriftelijke melding kan contact opgenomen worden met het RIVM/SEC/Bureau GGO, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven of via faxnummer 030-2744401.
Bij een telefonische melding als bedoeld in het derde en vierde lid, kan 24 uur per dag contact opgenomen worden met het Ministerie van IenM, 070-3832425. Tijdens kantooruren kan ook contact opgenomen worden met het RIVM/SEC/Bureau GGO, telefoonnummer 030-2742793.
6. Bij een melding, als bedoeld in het derde en vierde lid, moeten aan de Staatssecretaris onverwijld de gegevens zoals gevraagd in het bij de beschikking gevoegde meldingsformulier "Meldingsformulier onverwachte situaties" worden doorgegeven. Dit formulier is beschikbaar via de website <http://bggo.rivm.nl>.

Artikel 6. Voorschriften met betrekking tot verslaglegging

1. De vergunninghouder is verplicht van de voortgang van de werkzaamheden, als bedoeld in Artikel 2, eerste lid, doelmatig en frequent een logboek bij te houden.
2. In het logboek, als bedoeld in het eerste lid, moeten tenminste de gegevens zoals vermeld in de bij deze vergunning behorende bijlage 'inhoud logboek' worden bijgehouden.
3. De vergunninghouder is verplicht het logboek, als bedoeld in het eerste lid, ter beschikking te houden van toezichthoudende ambtenaren.
4. De vergunninghouder is verplicht jaarlijks een verslag van verrichte werkzaamheden, voor het eind van het kalenderjaar waarin die werkzaamheden hebben plaatsgevonden, aangetekend te zenden aan de Staatssecretaris.
5. Voor het maken van het verslag van verrichte werkzaamheden, als bedoeld in het vierde lid, dient tenminste het bij deze vergunning gevoegde formulier 'verslag van verrichte werkzaamheden' volledig en naar waarheid te worden ingevuld.
6. De vergunninghouder is verplicht na voltooiing van de werkzaamheden die vallen onder de onderhavige vergunning voor introductie in het milieu voor het einde van het kalenderjaar een verslag in te dienen over de resultaten van de werkzaamheden. Hiertoe dient het rapportageformulier te worden gebruikt zoals dat is vastgelegd in de beschikking nr. 2003/701/EG van de Commissie van de Europese Gemeenschappen van 29 september 2003 (PbEU L254).



Artikel 7. Nadere eisen

De vergunninghouder dient te voldoen aan de door de Staatssecretaris te stellen nadere eisen als bedoeld in artikel 9.2.2.3 Wet milieubeheer, betreffende de voorschriften bedoeld in de voorgaande artikelen.

Den Haag, datum<<ONDERTEKENING_DATUM>>

De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu,
hier komt de handtekening

<<ONDERTEKENING_HANDTEKENING>>

en de naam van de ondertekenaar<<ONDERTEKENING_OFFICIELE_NAAM>>



BESCHRIJVING VAN VOorgenomen WERKZAAMHEDEN

Dit document mag geen vertrouwelijke gegevens bevatten

1. ALGEMENE GEGEVENS

- 1.1. Nummer van de vergunning: **“nummer vergunning”**
- 1.2. Het kalenderjaar waarvoor deze beschrijving van voorgenomen werkzaamheden geldt:
- 1.3. De datum waarop het eerste proefdier behandeld zal worden (alleen van toepassing indien de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden betrekking heeft op het jaar van start van de studie):

2. BESCHRIJVING VAN DE WERKZAAMHEDEN

- 2.1. Beschrijf het doel van de studie:
- 2.2. Geef een korte inhoudelijke beschrijving van de studie:
- 2.3. Geef een beschrijving van de te gebruikte batch van GGO(s) waarbij in ieder geval wordt vermeld:
 - een beschrijving van het/de GGO(s): de naam, aard van de vector, beschrijving van de modificaties:
 - de concentraties van de GGO(s):
 - aard van eventueel naast het/de GGO(s) aanwezige organismen of biologisch actieve stoffen:
 - de uit oogpunt van milieuveiligheid gestelde verwerpscriteria waaraan de batch voldoet:
- 2.4. Wat is de maximale dosis per toediening aan een proefdier, en wat is de maximale cumulatieve dosis die aan een proefdier in de studie toegediend wordt:
- 2.5. Beschrijf via welke toedieningsweg(en) het GGO aan het proefdier wordt toegediend:
- 2.6. Vermeld het aantal proefdieren die reeds in de studie opgenomen zijn en vermeld het aantal proefdieren dat nog geïncubeerd zal worden in de studie:
- 2.7. Geef de volgende locatiegegevens, waaronder bezoekadressen en nummers van de ruimten, van:
 - de bewaarplaats(en) van de batch:
 - de bewaarplaats(en) van biologisch materiaal anders dan afval, afkomstig uit deze studie:
 - de plaats(en) waar de batch bereid wordt en waar handelingen worden uitgevoerd met biologisch (proefdier) materiaal afkomstig uit deze studie:
 - de plaats waar het logboek kan worden ingezien:
- 2.8. Geef de locatie (bezoekadres) waar proefdieren worden behandeld en gehuisvest:
- 2.9. Beschrijf hoe gevolg wordt gegeven aan de bijzondere voorschriften bedoeld in Artikel 4 van de vergunning:
- 2.10. Beschrijf alle, uit oogpunt van de veiligheid voor mens en milieu, te monitoren aspecten:

3. AFVALVERWERKING

- 3.1. Beschrijf de samenstelling van het verwachte afval:
- 3.2. Geef de locatie waar afval wordt opgeslagen voordat het wordt afgevoerd of vernietigd:
- 3.3. Beschrijf de wijze waarop het afval zal worden verwerkt:



INHOUD LOGBOEK

Dit document mag geen vertrouwelijke gegevens bevatten

1. ALGEMENE GEGEVENS

- 1.1. Vermeld het nummer van de vergunning. *“nummer vergunning”*

De volgende gegevens moeten in het logboek worden opgenomen:

2. BESCHRIJVING VAN DE WERKZAAMHEDEN

- 2.1. De datum van verzending van de jaarlijkse beschrijving van voorgenomen werkzaamheden aan het bevoegd gezag, en de datum van ontvangst van een eventuele reactie van het bevoegd gezag
- 2.2. Voor iedere batch:
- de datum van ontvangst
 - een kopie van de kwaliteitsgegevens
 - de actuele plaats van opslag
- 2.3. Voor ieder geïnccludeerd proefdier de resultaten van tests waaruit blijkt dat het proefdier voldoet aan de in de vergunning gestelde in- en exclusiecriteria
- 2.4. Voor iedere toediening aan een proefdier een beschrijving van eventuele onvoorziene omstandigheden die zich bij de toediening en/of na de toediening hebben voorgedaan, waarbij in ieder geval de volgende gegevens opgenomen dienen te zijn:
- de naam of codering van het proefdier
 - de maatregelen die zijn genomen om de gevolgen voor mens en milieu te beperken
 - de datum waarop en de autoriteit aan wie melding is gedaan
 - indien geen melding is gedaan: de reden waarom melding achterwege is gebleven
- 2.5. Gegevens over huisvesting (of dierverblijf) en beëindiging van deelname aan de studie van een proefdier:
- de naam of codering van het proefdier
 - datum van opname in huisvesting en locatie van huisvesting
 - datum van vertrek uit huisvesting of beëindiging van deelname aan de studie
 - de tests en de resultaten op grond waarvan besloten is tot beëindiging van de huisvesting
 - eventuele andere redenen voor beëindiging van de huisvesting of deelname aan de studie

3. VERVOER

- 3.1. Vermeld de data waarop materiaal is vervoerd buiten de instelling waar de behandeling van de proefdieren plaatsvindt en vermeld daarbij de hoeveelheid materiaal, het verzendadres en de wijze van verpakken. Het voorgaande geldt voor het studiemateriaal dat aan de proefdieren wordt toegediend maar ook voor monsters die mogelijk GGO's kunnen bevatten.

4. AFVALVERWERKING

- 4.1. Voor alle afval dat GGO's bevat of kan bevatten, inclusief alle van een proefdier afgenomen materiaal:
- de datum, de locatie en de manier van afvalverwerking
 - in geval van verbranding in een vuilverbrandingsinstallatie, voeg de schriftelijke bewijzen van vernietiging toe.



VERSLAG VAN VERRICHTE WERKZAAMHEDEN

Dit document mag geen vertrouwelijke gegevens bevatten

1. ALGEMENE GEGEVENS

- 1.1. Nummer van de vergunning: *“nummer vergunning”*
- 1.2. Jaar van verslaglegging:

2. BESCHRIJVING VAN DE WERKZAAMHEDEN

- 2.1. Beschrijf de proefopzet:
- 2.2. Beschrijf het doel van de proef:
- 2.3. Geef de namen van de gebruikte GGO's en beschrijf kort de genetische modificatie:

3. RESULTATEN

- 3.1. Beschrijf de resultaten van de verrichte werkzaamheden:
- 3.2. Vermeld het aantal proefdieren dat
 - in de verslagperiode nieuw is geïncubeerd:
 - reeds eerder werd geïncubeerd, en dit jaar nog deelnam aan het onderzoek:
 - in de toekomst nog geïncubeerd kan worden:
- 3.3. Geef aan hoeveel proefdieren dit jaar de studie hebben afgerond en hoeveel proefdieren dit jaar met de studie vroegtijdig zijn gestopt waarbij aangegeven moet worden wat hiervan de reden is geweest:
- 3.4. Beschrijf de onverwachte neveneffecten geconstateerd bij het uitvoeren van specifieke testen:
- 3.5. Beschrijf waargenomen afwijkingen ten opzichte van de vooraf verwachte resultaten die van belang kunnen zijn voor de milieurisicobeoordeling:
- 3.6. Beschrijf indien van toepassing de resultaten van de uitgevoerde monitoring:
- 3.7. Beschrijf hoe gevolg is gegeven aan de bijzondere voorschriften bedoeld in Artikel 4 van de vergunning:
- 3.8. Geef aan welke waarnemingen, die van belang zijn voor de beschreven milieurisicobeoordeling, gedaan zijn in andere vergelijkbare (inter)nationale studies: