

## **Milieurisicoanalyse bij de aanvraag IM 09-004**

**Datum: 12-07-2010**

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 uitgangsorganismen 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 uitgangsorganisme. Dit kan tot gevolg hebben dat het tropisme en het gastheerbereik van het uitgangsorganisme 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 09-004

**Titel aanvraag:** Een niet-pathogene *Rhodococcus equi* stam als vaccin in paarden

### 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. *Rhodococcus equi*, familie *Nocardiaceae*, is een pathogene (klasse 2) niet-sporulerende coccobacillus (B.3.4 \*)
2. *R. equi* komt wereldwijd in de bodem voor (B.3.3)
3. *R. equi* is ziekteverwekkend in paarden met een onvolwassen immuunsysteem. Vooral veulens tussen 4 en 12 weken zijn vatbaar. Dit komt waarschijnlijk doordat in deze periode de door de mery de hoeveelheid verkregen antilichamen in het veulen afneemt. Oudere dieren zijn immuun tegen de ziekte (A.2, B.3.4).
4. Veulens worden geïnficeerd doordat, bijvoorbeeld tijdens het grazen, stof wordt ingeademd dat de longen kan bereiken (B.3.3).
5. In de longen worden de bacteriën opgenomen door macrofagen, waarin ze zich vermenigvuldigen en overleven (A.2, B3.5).
6. Ziektebeeld is chronische longontsteking (fatale pyogranulomateuze pneumonie), meestal in combinatie met een zwerende dikke darm ontsteking (\*).
7. Ziektebeeld ontstaat één tot drie weken na infectie (B.3.5).
8. In gemiddeld 60% van de gevallen leidt de ziekte tot de dood van de veulens (\*).
9. *R. equi* kan in *vitro* door humane macrofagen worden opgenomen. In immuungecompromiteerde mensen (AIDS patiënten) kan de bacterie pneumonie veroorzaken. Bij gezonde mensen treden nooit ziekteverschijnselen op. Een infectie in kan adequaat met antibiotica behandeld worden. *R. equi* infecties in mensen met een normaal functionerend immuunsysteem zijn zeldzaam (B.3.4 \*).
10. Ziekteverwekkende *R. equi* bacteriën bezitten een 80-90 kb virulentie plasmide (B.3.7.).
11. Het virulentieplasmide is essentieel voor de inductie van immuniteit (B.3.7, D.3).
12. *R. equi* komt voor in andere landbouwhuisdieren, anders dan paarden, maar veroorzaakt daar normaal gesproken geen ziekteverschijnselen. Deze stammen hebben een afwijkend gastheerspecifiek virulentieplasmide en worden beschouwd als een intermediair pathogeen (B.3.5, F.1)
13. Virulentieplasmide bevat het gen voor virulentiefactor VapA en ook genen die coderen voor eiwitten die mogelijk een rol spelen bij conjugatie van plasmiden en replicatie (B.3.7).
14. Alle pathogene *R. equi* stammen hebben een virulentie plasmide. De virulentieplasmiden sluiten elkaar uit door incompatibiliteitssystemen; in één zelfde stam komen daardoor geen twee plasmiden naast elkaar voor (B.3.7, aanvullende info 07-12-2009, punt 2)
15. De incompatibiliteitsklasse en het gastheerbereik lijkt beperkt te zijn tot *R. equi* aangezien het VapA gen dat op het plasmide ligt nog nooit in een ander micro-organisme is teruggevonden (B.3.7).

16. *R. equi* overleeft lange tijd in zijn niche in het milieu (mest en bodem). De overlevingsduur is afhankelijk van omgevingstemperatuur en de pH van de bodem. Onder 10 graden Celsius is *R. equi* inactief. (B.3.6.)

**B. De genetische modificatie:**

17. Uit de wildtype *R. equi* RG2837 stam zijn vier genen (*ipdA<sub>1</sub>*, *ipdA<sub>2</sub>*, *ipdB<sub>1</sub>* en *ipdB<sub>2</sub>*) verwijderd om de ggo vaccinstam te verkrijgen (A.2, B3.9, aanvullende info 07-12-2009, punt 1).
18. De vier genen liggen op twee operons (*ipdAB* en *ipdAB2*) op het chromosoom (dus niet op het virulentieplasmide). Het is onwaarschijnlijk dat deze chromosomale deleties op eenvoudige wijze worden opgeheven door plasmide-overdracht. Daarvoor zou het nodig zijn dat de plasmiden eerst de chromosomale genen oppikken.
19. De deletiemutanten zijn op de volgende manier verkregen. Een vector met daarin operon-flankerende sequenties wordt in de bacterie gebracht en het gehele plasmide recombineert in het operon van de bacterie. Bij deze recombinatie worden beide operons bijna geheel verwijderd uit het genoom en vervangen door de vector sequenties. Op de vector ligt het apramycine resistentiegen en de genen die coderen voor cytosine deaminase en uracil fosforibosyltransferase. Deze laatste twee zorgen voor 5-fluorocytosine gevoeligheid. Een apramycine resistente en 5-fluorocytosine gevoelige stam is daarna gekweekt zonder enige vorm van selectie en de cultuur is uitgeplaat op platen die 5-fluorocytosine bevatten. Alleen die bacteriën die groeien op deze platen hebben de vector eruit gegooid zijn weer wildtype of schone deletie mutant geworden. Bacteriën die 5-fluorocytosine ongevoelig en apramycine gevoelig bleken zijn vervolgens met ebhulp van PCR getest waarin niet alleen de deletie is aangetoond maar ook dat er geen vector materiaal in de recombinant *R. equi* is achtergebleven. Deze techniek laat geen vectorsequenties zoals promotor, regulatoire of antibiotica resistenties coderende DNA sequenties, achter in het organisme. Op deze manier is er een 'schone' deletiemutant gecreëerd (A.2, B.3.9, aanvullende info 07-12-2009, punt 1).
20. De genen liggen in de regio van het genoom van *R. equi* dat codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij de afbraak van cholesterol en andere steroïden. Op basis hiervan verwacht men dat de genen betrokken zijn bij een omzetting van een van de intermediären in de afbraak van steroïden (aanvullende info 26-01-2010, punt 1).
21. De *ipdA* en *ipdB* (*ipdA<sub>1</sub>*, *ipdA<sub>2</sub>*, *ipdB<sub>1</sub>* en *ipdB<sub>2</sub>*) genen spelen geen rol in de gastheerspecificiteit (aanvullende info 07-12-2009, punt 2).

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

<b>Coderende sequenties gebruikt voor genetische modificatie</b>	<b>Herkomst</b>	<b>Plaats in de vector</b>	<b>Aanwezigheid in patiënt of proefdier</b>
Afwezigheid van de <i>ipdA</i> en <i>ipdB</i> genen.	<i>R. equi</i>	-	Niet meer functioneel - vrijwel gehele deletie

**C. Het GGO:**

22. De vaccinstam mist de vier genen en dit heeft tot gevolg dat het ggo niet meer kan overleven en vermenigvuldigen in macrofagen. Doordat er in de longen geen vermenigvuldiging in macrofagen optreedt zal de vaccinstam geen pneumonie veroorzaken (B.3.11, F.2, G.4 aanvullende info 07-12-2009 punt 3, aanvullende informatie 19-05-2010).

23. De vaccinstam kan zich niet handhaven in de longen en wordt opgeruimd. Een luchtweginfectie is daarom een 'doodlopende weg' voor het vaccin (aanvullende info 26-01-2010 punt 2, aanvullende informatie 03-03-2010 punt 5).
24. Aangezien het vaccin oraal of rectaal zal worden toegediend blijft de vaccinstam lokaal en tijdelijk in de darm aanwezig, maar zal niet naar andere organen verspreiden (B.3.12, C.1, aanvullende info 26-01-2010 punt 2, aanvullende informatie 03-03-2010 punt 5).
25. Groei van de vaccinstam in de darm is niet uitgesloten, evenals vermindering door afsterving (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 1)
26. Waarschijnlijk vindt groei plaats in de darmen waarbij een interactie met het immuunsysteem plaatsvindt. (B.3.13)
27. De verwijderde genen komen voor in verwante pathogene en niet-pathogene bacteriën (*Mycobacteria*, *Norcardia*, *Rhodococci*) waardoor het waarschijnlijk is dat het een voordeel is om deze genen te behouden. Er zijn geen verwante stammen in de natuur gevonden die deze genen missen. Er is blijkbaar geen evolutionair voordeel om de genen te verwijderen (aanvullende info 07-12-2009 punt 2).
28. Indien *Rhodococci* uit andere diersoorten de deletie van de vaccinstam zouden overnemen dan zouden ze eveneens geattenuëerd zijn (F.1).
29. Reversie van een deletie in de recombinant *R. equi* kan theoretisch optreden in aanwezigheid van wildtype DNA. De kans hierop is zeer klein, aangezien het een chromosomale deletie betreft en nagenoeg het gehele operon verwijderd is. Voor reversie dienen daarbij zowel de *ipdA* en *ipdB* genen over te gaan. Aangezien de vaccinstam een 'schone' deletiemutant is zal een eventuele reversie in het uiterste geval kunnen leiden tot een wildtype *R. equi* bacterie (F.1, aanvullende info 07-12-2009 punt 2 en 26-01-2010, punt 1).
30. Vanuit gevaccineerde veulens kan tijdelijk lage hoeveelheden van de vaccinstam via de feces in het milieu terechtkomen (C.1, F.1, G.3, aanvullende informatie 03-03-2010 punt 1)
31. Uitscheiding van de vaccinstam is bij ongeveer 25% van de dieren drie weken na vaccinatie nog aangetoond. Dit zijn enkele kolonies op een rectale swab. Uitgaande dat via een swab 10-100 microgram feces op de kweekplaat wordt uitgesmeerd betekent dit dat er tussen de  $3 \times 10^4$  en  $3 \times 10^5$  bacteriën per gram feces zit. In een vergelijkbare studie waarin zogenaamde 'contact veulens' werden opgenomen, werd in deze dieren geen besmetting door de vaccinstam waargenomen (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 1).
32. Een dosis van  $10^6$  CFU wildtype *R. equi*, intratracheaal toegediend is in staat om ziekte te veroorzaken bij veulens. Indien een veulen één gram feces van een met het ggo gevaccineerd dier zou inademen dan is de ingesnoeven dosis nog steeds lager dan de infectieuze dosis van wildtype *R. equi* (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 4).
33. Buiten de gastheer lijkt de vaccinstam niet geattenuëerd en zowel de vaccinstam als wildtype *R. equi* kunnen tenminste 6 maanden in het milieu (bodem, mest) overleven. Maar de vaccinstam overleeft niet beter dan de uitgangsstam (B.3.13, C1, aanvullende info 07-12-2009, punt 3, aanvullende info 26-01-2010 punt 3).

#### **D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten**

34. De vaccinstam is na korte tijd (ongeveer 3 weken) niet meer terug te vinden in de longen en andere organen van veulens die  $4 \times 10^6$  cellen van de vaccinstam intratracheaal toegediend hadden gekregen. Ook na orale toediening van  $2 \times 10^{10}$  CFU bleek de vaccinstam veilig voor jonge veulens (B.3.12, C.1, aanvullende info 26-01-2010 punt 2, aanvullende info 19-05-2010).
35. Veulens scheiden tijdelijk lage hoeveelheden van de vaccinstam uit via de feces maar er is geen verspreiding naar contactdieren gevonden. De vaccinstam blijft tijdelijk lokaal in de darm aanwezig maar verspreidt zich niet naar andere organen (C.1, aanvullende info 19-05-2010).



36. Overlevingstest in drinkwater, vijverwater en in de grond tonen aan dat de overleving van het ggo vaccin vergelijkbaar is met wildtype *R. equi* (B3.13, G.3, aanvullende info 07-12-2009, punt 3, aanvullende info 19-05-2010).
37. Na oronasale toediening aan 4-weken oude muizen ( $6,6 \times 10^8$  CFU), 4-weken oude ratten ( $1,3 \times 10^9$  CFU), 4-weken oude SPF kippen ( $1,3 \times 10^9$  CFU), varkens ( $1,1 \times 10^9$  CFU) en 4-weken oude kalveren ( $1,1 \times 10^9$  CFU) werd geen rectale uitscheiding van de vaccinstam of wildtype *R. equi* waargenomen. In deze dieren treedt dus uitdoving op. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook tijdens het post-mortem onderzoek werden geen klinische effecten gevonden. (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 5, aanvullende info 19-05-2010).
38. De genetisch gemodificeerde *R. equi* RG2837 stam overleeft minder goed in humane macrofagen dan de wildtype bacteriestam. Hieruit blijkt dat de vaccinstam een gereduceerde persistentie heeft in humane macrofagen, waardoor het aannemelijk is dat de vaccinstam in mensen verminderd pathogeen is ten opzichte van *R. equi*. (aanvullende info 19-05-2010)

#### **E. Proefdiergebonden aspecten:**

39. Het doel van de studie is het ontwikkelen van een vaccin tegen *R. equi* pneumonie in veulens (A.5)
40. De vaccinatie werkzaamheden zullen worden uitgevoerd op conventionele bedrijven van Intervet in de gemeente Sint Anthonis (aanvullende informatie 11-01-2010)
41. Proefdieren worden geselecteerd op algemene gezondheidstoestand (G.1).
42. Er zullen maximaal 2000 veulens gevaccineerd worden (A.4)
43. Het ggo vaccin wordt oraal en/of rectaal toegediend (B.3.12, E.3).
44. Dosis varieert van  $10^8$  CFU tot  $10^{10}$  CFU, die een tot twee keer worden toegediend. In geval van twee doseringen is er een interval van twee weken tussen de vaccinaties (E.2).
45. Veulens zijn tussen 3 dagen en 6 maanden oud op moment van vaccinatie (E.2, G.1).
46. Monstername omvat bloed (serum) monsters voor antilichaamtiteraties. Deze monsters bevatten geen ggo omdat aangetoond is dat de vaccinstam niet naar de bloedbaan gaat (E.4, G.6).
47. Monsters worden getest in laboratoria van Intervet (IG 99-123) (aanvullende info 07-12-2009, punt 5)
48. Dieren worden gehouden volgens normale farm routines in stallen of afgerasterde weilanden (E.5, G.3, G.4, G.5, aanvullende info 26-01-2010 punt 4)
49. Proefdieren worden gedurende de proef niet in aanraking gebracht met dieren die geen deel uitmaken van de proef (E.5.)
50. De proefdieren blijven maximaal 6 maanden in het experiment, na afloop kunnen de dieren de proef verlaten zonder extra maatregelen (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 9)

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

51. Het is een feit dat het ggo tijdelijk en in geringe mate wordt uitgescheiden en lang kan overleven in het milieu (mest en aarde). Monitoring is niet opgezet omdat dit alleen bevestigd zal worden (H.1, H.2, aanvullende info 07-12-2009, punt 4).
52. Afval (voornamelijk paardenmest), wordt afgevoerd via normale farmroutines (H.3, aanvullende info 26-01-2010 punt 2).
53. Mest kan op het land worden uitgereden (aanvullende informatie 03-03-2010 punt 8).
54. Er worden geen maatregelen in acht genomen om verspreiding van het ggo tegen te gaan (E.5, H.3, H.4.)
55. Het is theoretisch mogelijk om dieren die *R. equi* uitscheiden oraal antibioticum toe te dienen om de *R. equi* te verwijderen (aanvullende info 07-12-2009, punt 4)

#### **G. Productie en Batch**

56. Productie vindt plaats onder IG 99-123 (D.1).

57. Productie van de cultuur vindt plaats op vloeibaar medium. Na groei wordt de cultuur gevriesdroogd. Kwaliteitscontrole vindt plaats op restvocht, reinheid, levendtelling (>10E7 CFU per batch) en determinatie. Daarnaast vindt er een PCR test plaats ter bevestiging van de deletie en een PCR test ter bevestiging van de aanwezigheid van het virulentieplasmide (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 *Rhodococcus equi* RG2837:**

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<b>A. Persistentie en invasiviteit</b>		
<p>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.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van bijvoorbeeld een virale vector (i.e. het GGO) ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes van het GGO in, 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.</p> <p>De gebruikte genetisch gemodificeerde bacterie is ontwikkeld door een viertal genen te verwijderen met behulp van een</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>Wildtype <i>R. equi</i> komt wereldwijd in de bodem voor, en is ziekteverwekkend in paarden met een onvolwassen immuunsysteem. De bacterie wordt ingeademd door veulens en bereikt zo de longen. Opname door de mond kan ook oraal plaatsvinden via grond en mest bij grazen. In de longen infecteren de bacteriën de macrofagen, waarin ze zich vermenigvuldigen. Het ziektebeeld ontstaat 1-3 weken na infectie en omvat chronische longontsteking (fatale pyogranulomateuze pneumonie), meestal in combinatie met een zwerende dikke darm ontsteking. In gemiddeld 60% van de gevallen leidt de ziekte tot de dood van de veulens.</p> <p><i>R. equi</i> komt voor in landbouwhuisdieren anders dan paarden, maar veroorzaakt daar normaal gesproken geen ziekte. Deze stammen hebben afwijkende gastheerspecifiek virulentieplasmiden en worden beschouwd als intermediair pathogenen. Het virulentieplasmide bevat het gen voor virulentiefactor VapA en ook genen die coderen voor eiwitten die een rol spelen bij conjugatie van plasmiden en replicatie.</p> <p><i>R. equi</i> kan humane macrofagen in vitro infecteren, in immuun gecompromitteerde individuen (AIDS patiënten) kan de bacterie eveneens pneumonie veroorzaken. <i>R. equi</i> infecties in gezonde mensen zijn zeldzaam. Een eventuele infectie kan adequaat met antibiotica behandeld worden.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>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.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>Door de introductie van de deleties in het genoom van de <i>R. equi</i> stam is het GGO veranderd in persistentie en invasiviteit. Er is sprake van attenuering in de gastheer. Het GGO is niet in staat te vermeerderen of te overleven in macrofagen. In de gastheer is de infectie uitdovend. Buiten de gastheer is het GGO niet minder persistent of invasief ten opzichte van het wildtype. De waarschijnlijkheid dat deze eigenschappen leiden tot verhoogde persistentie of invasiviteit is echter te verwaarlozen.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p> <p>Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit van de bacterie is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>recombinant DNA techniek. Op deze manier is er een 'schone' deletiemutant gecreëerd. Het resultaat is dat het ggo niet meer kan overleven en vermenigvuldigen in macrofagen. Doordat er in de longen geen vermenigvuldiging in macrofagen optreedt zal de vaccinstam geen pneumonie veroorzaken. Het is hierbij de vraag of deze deleties in het genoom leiden tot een verandering in persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot wildtype <i>R. equi</i>.</p>	<p><i>R. equi</i> overleefd overleeft tenminste 6 maanden in het milieu (mest en bodem). De overlevingsduur is afhankelijk van omgevingstemperatuur en de pH van de bodem. Onder 10 graden Celsius is <i>R. equi</i> inactief.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Als gevolg van de geïntroduceerde deleties is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO kan niet meer overleven en vermenigvuldigen in macrofagen. Hierdoor heeft de vaccinstam zijn ziekteverwekkende vermogen verloren, maar kan wel nog immuniteit opleveren tegen <i>R. equi</i>.</p> <p>De gastheerspecificiteit van het GGO is niet gewijzigd aangezien de verwijderde genen hierin geen rol spelen. De gastheerspecificiteit wordt bepaald door het nog aanwezige virulentieplasmide.</p> <p>De vaccinstam blijft na toediening tijdelijk lokaal in de darm aanwezig maar verspreidt niet naar andere organen en komt niet in de bloedbaan terecht. De vaccinstam kan zich niet handhaven in de longen en wordt opgeruimd. De vaccinstam is na korte tijd (ongeveer 3 weken) niet meer terug te vinden in de longen en andere organen van veulens die <math>4 \times 10^6</math> cellen van de vaccinstam intratracheaal toegediend hadden gekregen. Een luchtweginfectie is een doodlopende weg voor het vaccin.</p> <p>Vanuit gevaccineerde veulens kan tijdelijk lage hoeveelheden van de vaccinstam via de feces in het milieu terechtkomen. Buiten de gastheer in het milieu zijn de overlevingsmogelijkheden van de vaccinstam niet verminderd en zowel de vaccinstam als wildtype <i>R. equi</i> kunnen tenminste 6 maanden in het milieu (bodem, mest) overleven. Maar de vaccinstam overleeft niet beter dan de uitgangsstam.</p> <p>Uitscheiding van de vaccinstam via feces is bij ongeveer 25% van de dieren drie weken na vaccinatie nog in lage aantallen aangetoond. Dit zijn enkele kolonies op een rectale swab. Uitgaande dat via een swab 10-100 microgram feces op de kweekplaat wordt uitgesmeerd betekent dit dat er tussen de <math>3 \times 10^4</math> en <math>3 \times 10^5</math> bacteriën per gram feces zit. Een dosis van <math>10^6</math> CFU wildtype <i>R. equi</i>, intratracheaal toegediend is in staat om ziekte te veroorzaken bij veulens. Indien een veulen één gram feces van een met het GGO gevaccineerd dier zou inademen dan is de ingesnoeven dosis nog steeds lager dan de infectieuze dosis van wildtype <i>R. equi</i>. In een vergelijkbare studie waarin zogenaamde 'contact veulens' werden opgenomen, werd in deze dieren geen besmetting door de</p>	
---	--	--



	vaccinstam waargenomen.	
<b>B. Selectieve voordelen</b>		
<p>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.</p> <p>Het is hierbij de vraag of door de geïntroduceerde deleties in het genoom, leiden tot een selectief voordeel dat een verandering geeft in weefseltropisme, gastheerbereik en de mate van infectiviteit en virulentie van de stam in vergelijking tot het wildtype <i>R. equi</i>.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> 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.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Zoals reeds aangegeven onder onderdeel A van deze tabel, is het uiterst onwaarschijnlijk dat het afwezig zijn van het viertal genen, een versterkend effect hebben op de biologie van de bacteriestam. De verwijderde genen komen voor in verwante pathogene en niet-pathogene bacteriën (<i>Mycobacteria</i>, <i>Norcardia</i>, <i>Rhodococci</i>) waardoor het waarschijnlijk is dat het een voordeel is om deze genen te behouden. Er zijn geen verwante stammen in de natuur gevonden die deze genen missen. Er is blijkbaar geen evolutionair (selectief) voordeel om de genen te verwijderen.</p> <p>De geïntroduceerde deleties zijn niet van invloed op de virulentie, infectiviteit, weefseltropisme of gastheerbereik.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> 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.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de vier gedeleteerde genen leiden tot selectieve voordelen is te verwaarlozen.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de <i>R. equi</i> vaccinstam is verwaarloosbaar klein.</p>
<b>C. Kans op geverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</b>		
<p>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.</p> <p>De vraag is of de deleties geheel of gedeeltelijk kunnen worden overgedragen naar andere bacteriestammen en of dit vervolgens voor deze stammen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel.</p> <p>Selectieve voor of nadelen kunnen alleen optreden als de deleties op een of andere manier een interactie hebben met de levenscyclus van de bacterie.</p> <p>De geïntroduceerde deleties in de twee operons van de genen zijn gelokaliseerd op het bacteriële chromosoom. Vanwege de</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> Eventuele homologe recombinatie tussen het GGO en de (wildtype) uitgangsstam zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Het GGO is een 'schone' deletiemutant. Aan een dergelijke uitwisseling zijn geen gevolgen verbonden, omdat de ontstane stammen identiek zijn aan de uitgangsstammen.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> De kans op uitwisseling van de deleties is zeer klein, aangezien het een chromosomale deletie betreft en nagenoeg het gehele operon verwijderd is. Voor reversie dienen daarbij zowel de <i>ipdA</i> en <i>ipdB</i> genen over te gaan. Aangezien de vaccinstam een 'schone' deletiemutant is zal een eventuele reversie in het uiterste geval kunnen leiden tot een wildtype <i>R. equi</i> bacterie. Aangezien er geen schadelijke effecten geïdentificeerd zijn is de vraag naar de waarschijnlijkheid niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Wanneer het GGO de deletie uitwisselt met een soortgelijke stam met een ander gastheerbereik, dan zal de stam ook geattenuerd zijn in zijn gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid van het optreden van recombinatie is zeer klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van geverdracht is verwaarloosbaar klein.</p>



locatie van de deleties op het chromosoom, zal complementatie van de deleties via conjugatie van plasmiden niet kunnen optreden.		
<b>D. Effecten op doel en niet-doel populaties</b>		
<p>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.</p> <p>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.</p> <p>De vraag is welke effecten de deleties kunnen hebben op de niet-doelpopulatie. Gezien het gastheerbereik van <i>R. equi</i> worden hieronder paarden verstaan.</p> <p>Met effecten worden schadelijke en niet-schadelijke effecten bedoeld, zoals eventuele toxische en allergene effecten.</p> <p>Specifieke gezondheidseffecten voor de mens worden onderonderdeel E besproken. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de deleties kunnen hebben op de mens.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel A van deze tabel. Wildtype <i>R. equi</i> is alleen ziekteverwekkend in paarden met een onvolwassen immuunsysteem. <i>R. equi</i> komt voor in landbouwhuisdieren anders dan paarden, maar veroorzaakt daar normaal gesproken geen ziekte.</p> <p>Als gevolg van de geïntroduceerde deleties is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO is niet in staat te overleven in macrofagen. Na oronasale toediening van het GGO aan muizen, ratten, kippen, varkens en kalveren werd geen rectale uitscheiding van de vaccinstam of wildtype <i>R. equi</i> waargenomen. Daarbij werden geen klinische effecten waargenomen. Ook tijdens het post-mortem onderzoek werden geen klinische effecten gevonden. In deze dieren treedt dus uitdoving op.</p> <p>De vaccinstam heeft zijn ziekteverwekkende vermogen verloren, maar kan het wel immuniteit opleveren tegen <i>R. equi</i>.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Vanuit gevaccineerde veulens kan tijdelijk lage hoeveelheden van de vaccinstam via de feces in het milieu terecht komen. Uitscheiding van de vaccinstam via feces is bij ongeveer 25% van de dieren drie weken na vaccinatie nog aangetoond. Dit zijn enkele kolonies op een rectale swab. Uitgaande dat via een swab 10-100 microgram feces op de kweekplaat wordt uitgesmeerd betekent dit dat er tussen de <math>3 \times 10^4</math> en <math>3 \times 10^5</math> bacteriën per gram feces zit. Een dosis van <math>10^6</math> CFU wildtype <i>R. equi</i>, intratracheaal toegediend is in staat om ziekte te veroorzaken bij veulens. Indien een veulen één gram feces van een met het GGO gevaccineerd dier zou inademen dan is de ingesnoeven dosis nog steeds lager dan de infectieuze dosis van wildtype <i>R. equi</i>.</p> <p>De waarschijnlijkheid van het optreden van een schadelijk effect als gevolg van blootstelling aan het GGO is zeer klein.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>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.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is zeer klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p> <p>Het risico van het optreden van effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p>



<b>E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid</b>		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld de deleties leiden tot verandering in weefsel tropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype <i>R. Equi</i>.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn aan de orde geweest in onderdeel D.</p> <p>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.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel A en D van deze tabel. Wildtype <i>R. equi</i> kan humane macrofagen <i>in vitro</i> infecteren. In immuungecompromiteerde mensen (AIDS patiënten) kan de bacterie eveneens pneumonie veroorzaken. Onder laboratorium omstandigheden is aangetoond dat de genetisch gemodificeerde <i>R. equi</i> RG2837 stam overleeft minder goed in humane macrofagen dan de wildtype bacteriestam. Hieruit blijkt dat de vaccinstam een gereduceerde persistentie heeft in humane macrofagen, waardoor het aannemelijk is dat de vaccinstam in mensen verminderd pathogeen is ten opzichte van <i>R. equi</i>. Infecties met <i>R. equi</i> in mensen met een normaal functionerend immuunsysteem zijn zeldzaam. Een infectie kan met antibiotica behandeld worden.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Zoals in onderdeel A en D besproken is, is de kans dat het GGO vanuit gevaccineerde veulens andere mensen kan infecteren en ziekte kan veroorzaken verwaarloosbaar klein.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>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.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p> <p>Het risico van het optreden van effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.</p>
<b>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</b>		
<p>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.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>Er is geen sprake van consumptie.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>Niet van toepassing.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>Niet van toepassing.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p> <p>Niet van toepassing.</p>
<b>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</b>		
<p>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.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>Als gevolg van de geïntroduceerde deleties is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. Het GGO is niet in staat te overleven in macrofagen.</p> <p><i>R. equi</i> overleeft overleeft lange tijd in het milieu (mest en bodem). De overlevingsduur is afhankelijk van omgevingstemperatuur en de pH van de bodem. Onder 10 graden Celsius is <i>R. equi</i> inactief. Buiten de gastheer in het milieu zijn de overlevingsmogelijkheden van de vaccinstam</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>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.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p>



	<p>niet verminderd en zowel de vaccinstam als wildtype <i>R. equi</i> kunnen tenminste 6 maanden in het milieu (bodem, mest) overleven. Maar de vaccinstam overleeft niet beter dan de uitgangsstam. Het is onwaarschijnlijk dat als gevolg van de deleties schadelijke effecten optreden op de microbiële populaties.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> De verwijderde genen komen voor in verwante pathogene en niet-pathogene bacteriën (<i>Mycobacteria</i>, <i>Norcardia</i>, <i>Rhodococci</i>) waardoor het waarschijnlijk is dat het een voordeel is om deze genen te behouden. Er zijn geen verwante stammen in de natuur gevonden die deze genen missen. Er is blijkbaar geen evolutionair voordeel om de genen te verwijderen. De kans dat er schadelijke effecten optreden is verwaarloosbaar klein.</p>	<p>Het risico van het optreden van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu is verwaarloosbaar klein.</p>
<b>H. Ongewenste beïnvloeding van biogeochemische processen</b>		
<p>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).</p> <p>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.</p> <p>De vraag is of de deleties van de genen in <i>R. equi</i> leiden tot anti-microbiële of toxische effecten op de bodem(micro)flora of fauna, waardoor de biogeochemische processen in de bodem kunnen worden beïnvloed.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</b> De evaluatie van de mogelijke schadelijke effecten zijn reeds besproken in onderdeel G van deze tabel. Als gevolg van de geïntroduceerde deleties is het GGO ten opzichte van de wildtype stam sterk geattenuëerd in de gastheer. De verwijderde genen liggen in de regio van het genoom van <i>R. equi</i> dat codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij de afbraak van cholesterol en andere steroïden.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Aangezien de verwijderde genen betrokken zijn bij de afbraak van cholesterol en andere steroïden in <i>R. equi</i> is het onwaarschijnlijk dat biogeochemische processen in de bodem worden beïnvloed.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid van het optreden van effecten op biogeochemische processen is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van negatieve effecten op het bodemleven is verwaarloosbaar klein.</p>





<b>I. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk</b>		
<p>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.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het GGO kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of de deleties in het genoom van <i>R. equi</i> zullen leiden tot veranderingen in de medische of veterinaire praktijk.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> Wildtype <i>R. equi</i> kan behandeld worden met antibiotica. Het GGO is geattenuerd in de gastheer en veroorzaakt daar geen ziektebeeld. Er zijn geen schadelijke effecten op verandering in de medische of veterinaire praktijk te identificeren.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Het GGO is evenals het wildtype gevoelig voor antibiotica. Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> Niet van toepassing.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



### DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicoanalyse van de voorgestelde introductie van de deletiemutant *Rhodococcus equi* RG2837 uitgevoerd. Potentieel significante risico's zijn die risico's waarvan niet is vastgesteld dat deze risico's geen significante effecten hebben.

<b>Schatting van het risico dat aan de toepassing van alle gedeleteerde sequenties is verbonden</b>	<b>Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's.</b> <i>(Eventuele aanvulling op strategieën die reeds zijn opgenomen in de aanvraag)</i>	<b>Bepaling van het algehele risico van het GGO</b>
Voor de <i>R. equi</i> deletiemutant is geconcludeerd dat er geen sprake is van een risico voor mens en milieu. Het GGO is geattenuerd, kan geen ziekte veroorzaken, maar kan zich wel verspreiden in het milieu. Ten gevolge hiervan kunnen derden 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.