

De minister van Volkshuisvesting,  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 7 september 2009  
**KENMERK** CGM/090907-02  
**ADVIES** Genetisch gemodificeerde teek *Rhipicephalus microplus*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel “Ontwikkeling van een transformatiesysteem bij de teek *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*” van de faculteit der Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is verzocht te adviseren over de vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde (gg) teken behorend tot de soort *Rhipicephalus microplus*. Deze teek komt voor in (sub)tropische gebieden en voedt zich voornamelijk op runderen of hertachtigen. De aanvrager wil onderzoeken of er op efficiënte wijze gg-teken vervaardigd kunnen worden door injectie van een marker-gen in de hemolymfe van volwassen vrouwtjes met als doel de eitjes van de teek te transduceren. De aanvrager is van plan de expressie van het marker-gen niet alleen in de eerste generatie te analyseren, maar ook in de daarop volgende generatie. Om deze tweede generatie te verkrijgen is het noodzakelijk dat de teek bloedmalen kan nuttigen op zijn gastheer. In de voorgenomen experimenten wordt gebruik gemaakt van runderen. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden met de gg-teken in associatie met de runderen uit te mogen voeren op D-1 niveau. Om de teken in te perken worden een aantal voorzorgsmaatregelen voorgesteld. *R. microplus* is nog nooit aangetroffen in Nederland. Bovendien is de COGEM van mening dat *R. microplus* zich onder de huidige klimatologische omstandigheden niet kan vestigen in Nederland. Daarentegen kan zij niet uitsluiten dat deze teek in een periode met warm (circa 24°C) en vochtig weer tijdelijk in staat is te overleven.

De speciale laboratoria voor werkzaamheden met micro-organismen zijn niet specifiek toegerust op de inperking van teken. Derhalve is de COGEM van mening dat in onderhavige aanvraag het inperkingsniveau van het laboratorium van ondergeschikt belang is. De mate van inperking is afhankelijk van de aanvullende teek-specifieke maatregelen.

De COGEM kan instemmen om de beschreven werkzaamheden uit te voeren in een D-I faciliteit. Daarbij adviseert zij enkele voor *R. microplus* gevalideerde fysieke barrières aan te leggen en gevalideerde methoden voor desinfectie van afval en werkkleding te hanteren. Onder navolging van deze maatregelen en door de inperkende effecten van het huidige Nederlandse klimaat acht de COGEM de risico's van beschreven werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van dr. L.S. van Overbeek werkzaam in de Plant Sciences Group aan de Wageningen Universiteit.*

# Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Rhipicephalus microplus* teken

COGEM advies CGM/090907-02

## Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de vergunningaanvraag getiteld 'Ontwikkeling van een transformatiesysteem bij de teek *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*'. De aanvrager wil onderzoeken of deze (sub)tropisch runderteek genetisch gemodificeerd kan worden door injectie van DNA, coderend voor de marker 'Enhanced Green Fluorescent Protein' (EGFP) in de hemolymfe van vrouwtjes teken. Ter bevordering van de integratie van het gen van interesse in het genomische DNA van de teek wordt gebruik gemaakt van het zogenaamde Minos transposonsysteem. Met deze methode tracht de aanvrager de eitjes die aanwezig zijn in de vrouwtjes teek te transduceren. Uit de getransduceerde eitjes kunnen zich vervolgens genetisch gemodificeerde teken ontwikkelen, die in dit geval EGFP tot expressie zullen brengen.

## *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* behoort tot de familie der *Ixodidae* en is een zogenaamde harde teek. *R. microplus* komt van nature voor in tropische en subtropische gebieden en is endemisch in India, (sub)tropisch Azië, het noordoosten van Australië, Madagaskar, Zuidoost Afrika, het Caribische gebied en vele landen in Zuid en Centraal Amerika. De teek is uitgeroeid in de Verenigde Staten, maar wordt soms nog aangetroffen in de bufferzone langs de Mexicaanse grens.<sup>1</sup>

*R. microplus* parasiteert met name op runderen, herten en buffels, maar wordt ook wel aangetroffen op paarden, geiten, schapen, ezels, honden, varkens en enkele wilde zoogdieren.<sup>1</sup> Voor zover bekend bij de COGEM parasiteren deze teken niet op de mens. *R. microplus* voedt zich met het bloed van de gastheer. Nadat de eitjes van de teek zijn uitgekomen, doorloopt *R. microplus* drie verschillende ontwikkelingsstadia: het stadium van larf, nymph en volwassene. De volledige ontwikkeling vindt plaats op één dier. Voor de overgang naar een volgend stadium is een voeding op de gastheer noodzakelijk. Na bevruchting laat het volwassen vrouwtje zich van de gastheer afvallen en legt eenmalig een grote hoeveelheid eitjes.

De totale levenscyclus van *R. microplus* kan doorlopen worden in 3 tot 4 weken. Na deze periode kan elk vrouwtje tot 3500 eitjes leggen, die onder ideale omstandigheden in 3 weken uitkomen.<sup>2</sup> Hierdoor is deze teek in staat in korte tijd een grote plaag te vormen. In de zomer kan *R. microplus* 3 tot 4 maanden zonder voeding, in de winter kan de teek het 6 maanden zonder voeding uithouden. Een teek die niet binnen deze periode een geschikte gastheer vindt, zal uiteindelijk omkomen door een gebrek aan voedsel.

De aanwezigheid van de teken zelf heeft voor de gezondheid van het dier relatief milde gevolgen. Een grote tekenplaag kan voor het vee hooguit een vermindering van de groei of melkproductie tot gevolg hebben en een beschadiging van de huid.

*R. microplus* kan echter besmet zijn met protozoaire parasieten zoals *Babesia bigemina* en *Babesia bovis*, die de teek op de gastheer kan overdragen.<sup>1,3</sup> Deze protozoaire parasieten veroorzaken babesiosis of 'roodwaterkoorts'. Deze ziekte wordt gekenmerkt door hemolytische anemie en koorts. In veel gevallen leidt een infectie met deze protozoaire parasieten tot de dood van de gastheer. In geval van *B. bigemina* sterft 30% van de dieren, in het geval van *B. bovis* 70% tot 80%.<sup>4</sup>

Naast bovengenoemde protozoaire parasieten kan *R. microplus* ook besmet zijn met de bacterie *Anaplasma marginale* en *Borrelia theileri*. *Anaplasma marginale* veroorzaakt anaplasmose in de gastheer hetgeen wordt gekenmerkt door bloedarmoede en koorts. *Borrelia theileri* veroorzaakt het zogenaamde theileriosis in vee.

### **Genetisch gemodificeerd *R. microplus***

De aanvrager wil een transformatiesysteem ontwikkelen waarmee op efficiënte wijze gg-*R. microplus* teken kunnen worden verkregen. De aanvrager maakt gebruik maken van het Minos transposonsysteem waardoor het gen van interesse in het genoom van de teek wordt geïnsereerd. Minos behoort tot de mariner/Tc1 familie van transposons en is actief in verschillende insectensoorten. In onderhavige studie wordt gebruik gemaakt van een transposeerbaar Minos element, waarop het gen voor de marker EGFP is gelegen. Het EGFP is afkomstig uit de kwal *Aequorea victoria*. Het Minos transposase, dat verantwoordelijk is voor de integratie van het Minos element in het genomisch DNA van de teek, wordt *in trans* aangeboden. De aanvrager wil hiervoor een apart helperplasmide of synthetisch RNA gebruiken dat codeert voor het transposase. Voor de transformatie van *R. microplus* wordt het plasmide DNA coderend voor de marker EGFP samen met de helper in de hemolymfe gespoten van vrouwtjes teken. Op deze wijze verwacht de aanvrager (een deel van) de eitjes die in deze vrouwtjes aanwezig zijn, te kunnen voorzien van EGFP. Nadat het vrouwtje de eitjes heeft gelegd, zal ze dood gaan. Uit de eitjes kunnen zich gg-teken ontwikkelen, die EGFP tot expressie brengen. Naast de screening op de EGFP expressie en integratie van het Minos element in de generatie teken die zich uit te eitjes ontwikkelen, wil de aanvrager ook een volgende generatie teken bestuderen om inzicht te krijgen in de stabiliteit van de transformatie. Daartoe worden de larven in een afgesloten katoenen zakje op de rug van een rund bevestigd. Hierdoor kunnen ze de benodigde bloedmalen nuttigen om tot een volwassen teek uit te groeien en voor nageslacht te zorgen.

### **Eerder COGEM advies**

*R. microplus* is door de COGEM niet eerder geclassificeerd. Van de leden behorend tot de soort Rhipicephalus is *R. sanguineus* de enige die is ingedeeld. In de zogenaamde 'lijst van pathogene micro-organismen en agentia' is deze teek geclassificeerd in pathogeniteitsklasse 2.<sup>5</sup> De COGEM heeft in het verleden niet geadviseerd over werkzaamheden met genetisch modificeerde *R. microplus* of andere gg-teken.

### **Adviesvraag**

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de inschaling van de vervaardiging van en handelingen met genetische gemodificeerde *R. microplus* teken. Daarnaast is zij verzocht te adviseren over de aanvullende voorschriften die noodzakelijk zijn om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

### **Overwegingen en advies**

#### ***Overlevingskansen van R. microplus in Nederland***

*Rhipicephalus microplus* is een teek die voorkomt in (sub)tropische gebieden. Voor zijn ontwikkeling en overleving is deze teek afhankelijk van een hoge temperatuur en luchtvochtigheid. In Mexico komen deze teken voor in gebieden met een gemiddelde temperatuur van ongeveer 24°C en een gemiddelde luchtvochtigheid van ongeveer 22kPa/m<sup>3</sup>. In de gebieden in Mexico waar de gemiddelde temperatuur 20°C is en de gemiddelde luchtvochtigheid 16kPa/m<sup>3</sup> wordt *R. microplus* niet aangetroffen.<sup>6</sup> Voor de overleving en ontwikkeling van *R. microplus* wordt in dit experiment de temperatuur in de dierstal op 25°C gehouden en heerst er een hoge luchtvochtigheid.

In Nederland is over de jaren 1971-2000 een gemiddelde temperatuur gemeten van ongeveer 10°C.<sup>7</sup> Dit gemiddelde is ver verwijderd van de gemiddelde temperatuur die volgens de studie in Mexico nodig is om *R. microplus* een goede habitat te bieden. Zelfs in de zomermaanden, waarin Nederland een gemiddelde temperatuur kent van ongeveer 17°C wordt deze temperatuur niet gehaald.

Voor zover bekend, is *R. microplus* niet aanwezig in Nederland. In een studie naar de aanwezigheid van teken en geassocieerde pathogenen bij Nederlandse gedomesticeerde dieren in de periode tussen juli 2005 en oktober 2006 is *R. microplus* niet aangetroffen.<sup>8</sup> Het aantal koeien en herten (reeën), de voornaamste gastheren van *R. microplus* waarop teken werden aangetroffen was echter beperkt en het is onduidelijk hoeveel potentiële gastheren van *R. microplus* daadwerkelijk zijn onderzocht. Wel werden twee andere *Rhipicephalus* soorten gevonden. Het betrof *R. sanguineus* en *R. turanicus*. De teek *R. sanguineus* parasiteert bij voorkeur op de hond. *R. turanicus* heeft een breder gastheerspectrum.

Op basis van bovenstaande gegevens acht de COGEM de kans dat *R. microplus* zich in Nederland kan vestigen of een volledige levenscyclus kan doormaken verwaarloosbaar klein. Zij kan evenwel niet uitsluiten dat in een warme zomer de omstandigheden voor *R. microplus* tijdelijk geschikt zijn om een korte periode te overleven.

De aanvrager geeft aan dat de gebruikte tekenkolonie regelmatig is getest op de aanwezigheid van vrijwel alle door teken overdraagbare pathogenen. De kolonie is getest op *Anaplasma*, *Babesia*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Rickettsia* en *Theileria spp.* en altijd negatief bevonden voor deze pathogenen. Indien de runderen waarop de teken zich in het lab voeden vrij zijn van bovengenoemde pathogenen, zullen de teken vrij blijven van betreffende pathogenen. Derhalve zal *R. microplus* in het geval dat een teek onverhoopt uit het laboratorium in het milieu terecht komt, een externe gastheer niet direct kunnen besmetten met pathogenen. Daartoe zal de teek eerst zelf besmet moet worden door een bloedmaal op een besmette

gastheer. In Nederland is de dichtheid van grote herkauwers met een parasitaemie laag. Derhalve acht de COGEM de kans zeer klein dat de *R. microplus* teek in het Nederlandse milieu besmet zal raken met pathogenen. Bovendien verblijft *R. microplus* gedurende zijn levenscyclus op één gastheer. Hierdoor kan er pas verspreiding van de pathogenen plaats vinden als de larven van de volgende generatie op een nieuwe gastheer terechtkomen en een bloedmaal nemen. Door eerder genoemde voor *R. microplus* ongunstige klimatologische omstandigheden acht de COGEM deze kans verwaarloosbaar klein.

#### ***Overleving van gg-R. microplus in Nederland***

Het marker gen EGFP waarmee *R. microplus* getransduceerd wordt, wordt al vele jaren wereldwijd in allerlei organismen toegepast. Op basis van deze ervaring en gezien de eigenschappen van EGFP heeft de COGEM geen aanwijzingen aangetroffen dat de introductie van EGFP de fitness van *R. microplus* en daarbij de mogelijke overlevingskansen van deze teek in Nederland zal verhogen. De COGEM is derhalve van mening dat de beschreven genetische modificatie van *R. microplus* niet leidt tot een verhoging van het milieurisico.

#### ***Vervaardiging van en handelingen met gg-teken***

De aanvrager geeft aan dat de vrouwtjes teken in modelklei gefixeerd worden, voordat het DNA en/of synthetische mRNA ingespoten wordt. De injectie zal vervolgens worden uitgevoerd met behulp van een micromanipulator en een micropomp. Door deze gemechaniseerde werkwijze is de COGEM van mening dat de kans op prikincidenten geminimaliseerd is. Bovendien is zij van mening dat in het geval van een prikincident de hoeveelheid DNA die onbedoeld wordt overgebracht door deze werkwijze nihil zal zijn.

Na injectie worden de vrouwtjes in een afgesloten incubator geplaatst, waarin zij de eitjes zullen leggen. De zich ontwikkelende embryo's worden met behulp van fluorescentiemicroscopie onderzocht op de expressie van EGFP. De vrouwtjes overlijden na het leggen van de eitjes en de eitjes zelf zijn immobiel. Derhalve voorziet de COGEM geen milieurisico's, indien de analyse op EGFP expressie wordt uitgevoerd op ML-I niveau.

Naast de analyse van de embryo's op EGFP expressie wil de aanvrager in de larven de integratie van het Minos element onderzoeken. De larven zijn dusdanig licht dat er een risico is dat de larven op luchtstromen in het laboratorium meegevoerd kunnen worden. Derhalve wijst de COGEM erop dat het ontstaan van luchtstromen en open handelingen met de gg-larven zoveel mogelijk voorkomen dienen te worden. In de laboratoria voor werkzaamheden met micro-organismen (ML-I of hoger) gelden voor werkkleding en ramen voorschriften waardoor de larven tot op zekere hoogte worden ingeperkt. Om de mogelijke risico's nog verder te minimaliseren, adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren.

- De te gebruiken *R. microplus* teken zijn vrij van de door deze teken overdraagbare pathogenen,
- De gg-eitjes en larven dienen gehuisvest te worden in teek-dichte containers.

Op een ML-I inperkingsniveau en onder navolging van bovenstaande voorschriften is de COGEM van mening dat in het huidige Nederlandse klimaat de risico's van voorgenomen werkzaamheden met gg-*R. microplus* teken voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### ***Genetisch gemodificeerde teken in associatie met runderen***

Voor de ontwikkeling tot een volwassen teek heeft *R. microplus* een aantal bloedmalen van zijn gastheer nodig. Aangezien de dierlaboratoria ingeschaald op DM-I of hoger geen toegevoegde inperking van teken biedt ten opzichte van een D-I faciliteit, kan de COGEM instemmen met het voorstel de werkzaamheden in associatie met de runderen uit te voeren op D-I niveau. Zij merkt daarbij op dat voor de inperking van teken de nadruk dient te liggen op de aanvullende voorschriften.

Om de teken tijdens de bloedmalen in te perken, is de aanvrager voornemens de gg-larven in een afgesloten katoenen zakje op de rug van een rund te bevestigen. Er worden geen gegevens aangeleverd over de effectiviteit van het gebruikte inperkingsstelsel. De COGEM kan hierdoor niet uitsluiten dat teken ontsnappen uit het katoenen zakje. Zij is derhalve van mening dat de inperking van de gg-teken alleen gegarandeerd kan worden, indien aanvullende gevalideerde maatregelen worden getroffen. Het is daarbij evident dat ten tijde van het experiment de hechting van het zakje op de huid stevig is en het katoenen zakje zelf intact blijft en niet door het rund aangetast kan worden.

Als eerste inperkingsmaatregel stelt de aanvrager voor om rond het zakje een laag vaseline aan te brengen. De COGEM is van mening dat de vaseline de teken enigszins zal ophouden, maar niet volledig zal afstoppen. Daarnaast geeft de aanvrager aan een goot gevuld met een zeep-oplossing aan te brengen bij de wanden en de deur van het diervverblijf. Verdere details over deze zeep-oplossing en het effect op *R. microplus* worden niet door de aanvrager verstrekt. De COGEM merkt op dat voor de zogenaamde Safer's insectendodende zeep de dodende werking voor de teek *Ixodes scapularis* is aangetoond.<sup>9,10</sup> Een goot met een zeep-oplossing waarvan de *R. microplus* dodende werking is gevalideerd acht de COGEM derhalve een belangrijke fysieke barrière, waardoor de teek ingeperkt kan worden.

Bij een ontsnapping uit het zakje kunnen de gg-teken in de mest van het rund terechtkomen. De aanvrager geeft aan dat *R. microplus* maar een beperkte periode (96 uur) in mest kan overleven, maar levert daarvoor geen wetenschappelijke onderbouwing. De COGEM heeft bovendien in de literatuur geen gegevens aangetroffen die de beperkte overleving van *R. microplus* in mest bevestigen. Zij kan derhalve niet uitsluiten dat gg-*R. microplus* teken na een eventuele ontsnapping uit het zakje via de mest in het milieu terecht kunnen komen. De COGEM acht het daarom belangrijk dat de mest op een gevalideerde wijze gedesinfecteerd wordt, voordat deze in het milieu wordt gebracht.

De COGEM kan niet uitsluiten dat de gg-teken in de werkkleding terechtkomen. Ook voor de werkkleding is het derhalve noodzakelijk dat een gevalideerde methode wordt gebruikt om de gg-teken af te doden.

Om de milieurisico's van de werkzaamheden met gg-*R. microplus* in een D-1 faciliteit te minimaliseren, adviseert de COGEM op basis van bovenstaande overweging de volgende voorschriften te hanteren.

- Op de toegangsdeur dient de tekst 'Genetische gemodificeerde teken, geen toegang voor onbevoegden' aangebracht te worden en een signalering die waarschuwt dat het verblijf niet betreden mag worden gedurende de uitvoering van de werkzaamheden,
- Het rund is vrij van door *R. microplus* overdraagbare pathogenen,
- Het is voor het rund onmogelijk gemaakt de inperking van de zakjes waarin de teken zich bevinden te verstoren,
- De zakjes zijn zorgvuldig op de runderen bevestigd en rond het zakje is vaseline aangebracht,
- De drempel voor de deur en de goot rond de vloer waarop de runderen zich bevinden is gevuld met een zeep-oplossing of ander mengsel waarvoor op wetenschappelijk wijze de *R. microplus*-dodende werking is gevalideerd,
- Tweemaal per dag wordt de conditie van het zakje gecontroleerd,
- Het aantal teken in het zakje dient aan het begin en einde van het experiment vastgesteld te worden ten einde een mogelijke ontsnapping te kunnen uitsluiten/vaststellen,
- Totdat de telling uitwijst dat er geen teken uit het katoenen zakje zijn ontsnapt, dient alle mest geautoclaveerd of op andere gevalideerde wijze gedesinfecteerd te worden, voordat deze in het milieu wordt gebracht,
- Passende beschermende kleding en schoeisel wordt gedragen. De kleding en schoeisel wordt na afloop van de werkzaamheden in de werkruimte achtergelaten,
- Kapstokken voor dagelijkse kleding zijn buiten het verblijf aangebracht; kapstokken voor de werkkleding zijn in de sluis aangebracht,
- De werkkleding dient op passende wijze verpakt en geautoclaveerd of op andere gevalideerde wijze gedesinfecteerd te worden, alvorens de kleding wordt gewassen.

Met bovenstaande voorschriften en met het oog op de beperkte overlevingskansen van *R. microplus* in het huidige Nederlandse klimaat acht de COGEM de risico's van voorgenomen werkzaamheden met gg-*R. microplus* teken voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. The Center for Food Security & Public Health (2007) Internet:  
[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus\\_microplus.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf) (28-08-2009)
2. Northern Territory Government (2008) Internet:  
[http://www.nt.gov.au/d/Content/File/p/Anim\\_Dis/721.pdf](http://www.nt.gov.au/d/Content/File/p/Anim_Dis/721.pdf) (28-08-2009)
3. Walker AR *et al.* (2003) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. BioScience Reports, Edinburgh. 161-164



4. Sonenshine DE (2003) Ticks. In: Encyclopedia of insects. Edited by Resh VH en Cardé RT. Academic press, San Diego. 1132-1141
5. COGEM (1998). Regeling genetisch gemodificeerde organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling. Appendix A
6. Estrada-Pena A *et al.* (2006) The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 38:307-316
7. Milieu en natuurcompendium Internet:  
<http://www.milieuennatuurcompendium.nl/indicatoren/nl0004-Meteorologische-gegevens-in--Nederland.html?i=9-54> (03-09-09)
8. Nijhof AM *et al.* (2007) Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7: 585-595
9. Patrican LA & Allan SA (1995) Laboratory evaluation of desiccants and insecticidal soap applied to various substrates to control the deer tick *Ixodes scapularis*. *Med. Vet. Entomol.* 9: 293-299
10. Allan SA & Patrican LA (1994) Susceptibility of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to desiccants and an insecticidal soap. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 691-702

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van dr. L.S. van Overbeek werkzaam in de Plant Sciences Group aan de Wageningen Universiteit.*