

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J. J. Atsma  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 4 augustus 2011  
**KENMERK** CGM/110804-01  
**ONDERWERP** Advies: Veterinaire studie naar PM-MH vaccin in kalveren


Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 10-04 met de titel 'Live attenuated *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* deletion mutant vaccine (PM-MH) against respiratory disease in cattle' van Intervet International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

De COGEM is gevraagd te adviseren over een veterinaire studie met de genetisch gemodificeerde (gg-) bacteriestammen *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*. Deze gg-stammen missen genen die betrokken zijn bij de virulentie van de bacteriën. De aanvrager is van plan de bacteriestammen als combinatievaccin te testen in kalveren en verzoekt een vergunning voor de introductie in het milieu van dit combinatievaccin.

*P. multocida* en *M. haemolytica* komen wereldwijd voor in verschillende diersoorten en kunnen bij kalveren onder invloed van stress een chronische en veelal fatale longontsteking veroorzaken. Veiligheidsstudies tonen aan dat het combinatievaccin bij kalveren geen ziekte veroorzaakt of andere bijwerkingen heeft. Tevens veroorzaakt het combinatievaccin geen ziekte in geteste niet-doelwitorganismen. Op basis van de overlegde gegevens is de COGEM van mening dat het stammen betreft met een verminderde pathogeniteit voor kalveren. Hoewel de kans op uitscheiding van de vaccinstammen bij intranasale toediening aanwezig is, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij uitscheiding verwaarloosbaar klein aangezien het verzwakte stammen betreft. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat de vaccinstammen pathogeen zullen zijn voor niet-doelwitorganismen inclusief de mens.

De aanvrager geeft aan dat de gebruikte vaccinstammen schone deletiemutanten zijn zonder vreemde DNA sequenties. Echter, de aanvrager heeft de moleculaire karakterisering van de vaccinstammen beperkt tot een sequentieanalyse van het gebied rond de deletie. Er zijn geen gegevens geleverd met betrekking tot eventuele aanwezigheid van vectorsequenties elders in het genoom. Op basis van de aangeleverde informatie over de moleculaire karakterisatie kan de COGEM niet concluderen dat het hier schone deletiemutanten betreft. Daarom kan de COGEM op dit moment niet positief adviseren over de voorgenomen vaccinatiestudie.



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

Hoogachtend,



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

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

# Introductie in het milieu van *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* deletiemutanten

## COGEM advies CGM/110804-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag voor een veterinaire studie buiten inperking met genetisch gemodificeerde (gg-) *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* stammen. Voor de ontwikkeling van een vaccin tegen *P. multocida* en *M. haemolytica* infecties heeft Intervet International BV van beide stammen deletiemutanten gemaakt en wil deze deletiemutanten testen in kalveren. In het kader van deze studie verzoekt de aanvrager dit combinatievaccin in het milieu te mogen introduceren.

### *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*

*P. multocida* en *M. haemolytica* zijn niet-sporenvormende bacteriën die behoren tot de familie *Pasteurellaceae*. Deze bacteriën komen wereldwijd voor in verscheidene dieren.<sup>1</sup> *P. multocida* is van nature aanwezig in de luchtwegen en het spijsverteringskanaal van een groot aantal huisdieren en wilde dieren zoals runderen, schapen, varkens, kippen, konijnen, katten en honden.<sup>2</sup> Het gastheerbereik van *M. haemolytica* is beperkt tot herkauwers en de bacterie wordt algemeen aangetroffen in de bovenste luchtwegen van vee.<sup>1</sup> Door stressfactoren als transport, temperatuurswisselingen en virusinfecties kunnen beide bacteriën zich sterk vermenigvuldigen wat kan leiden tot een chronische en veelal fatale longontsteking.<sup>3</sup> Overdracht van *P. multocida* en *M. haemolytica* tussen runderen vindt voornamelijk plaats vanuit de longen via neus-neus transmissie. Het combinatievaccin dat in deze studie getest wordt, dient de kalveren immuniteit te geven tegen deze bacteriën.

### *P. multocida*

Er bestaan vijf serotypen van *P. multocida* (A, B, D, E en F) die geassocieerd worden met specifieke gastheren.<sup>4</sup> Serotype A is een veelvoorkomend serotype in herkauwers. Transmissie van de verschillende serotypen naar andere gastheersoorten komt niet vaak voor. De virulentie van *P. multocida* wordt in belangrijke mate bepaald door de aanwezigheid van een capsule bestaande uit verschillende polysacchariden. Deze capsule helpt de bacterie om fagocytose en complement-gemedieerde inactivatie tegen te gaan en zo de immuunrespons te ontwijken.<sup>5</sup>

In de wetenschappelijke literatuur zijn enkele voorbeelden beschreven van *P. multocida* infecties bij de mens. Deze infecties worden veelal geassocieerd met lokale wondinfecties als gevolg van bijt- en krabwonden door honden en katten. Doorgaans treedt infectie alleen op in sterk immuungecompromitteerde mensen. Een dergelijke infectie is over het algemeen goed te behandelen met antibiotica.<sup>6</sup>

De door de aanvrager gebruikte *P. multocida* uitgangsstam (NADC-1062) is uit de longen van een kalf geïsoleerd dat is overleden aan de gevolgen van een longontsteking. Deze stam behoort

tot serotype A. De capsule van deze bacterie bestaat uit twee polysaccharide monomeren. Deze monomeren worden geproduceerd onder invloed van de genen *hyaE*, *hyaD*, *hyaC*, *hyaB* en *hyaA*. Voor het vaccin heeft de aanvrager een deletiemutant van de *P. multocida* bacteriestam gemaakt, dat een deel van het *hyaE* gen mist. Door deze deletie bezit het resulterende genetisch gemodificeerde organisme (ggo) geen capsule meer.

#### *M. haemolytica*

Het gastheerbereik van *M. haemolytica* is beperkt tot herkauwers en de bacterie wordt algemeen aangetroffen in de bovenste luchtwegen van vee.<sup>1</sup> De COGEM is niet bekend met *M. haemolytica* infecties bij de mens. Hoewel *M. haemolytica* een reeks van potentiële virulentie factoren bezit, lijkt het leukotoxine een zeer belangrijke rol te spelen in de pathogenese. Het leukotoxine lyseert de leukocyten en bloedplaatjes van herkauwers en vermindert hierdoor o.a. de afweerreactie.<sup>7,8,9</sup> Het leukotoxine wordt gevormd onder invloed van vier genen: *lktA*, *lktC*, *lktB* en *lktD*. Van deze genen codeert het *lktA* daadwerkelijk voor het toxine en *lktC* codeert voor een eiwit dat het toxine post-translationeel activeert. Voor het vaccin heeft de aanvrager een deletiemutant gemaakt waaruit een deel van het *lktA* gen is verwijderd.

#### **Eerder COGEM advies**

*P. multocida* en *M. haemolytica* zijn in de Regeling ggo ingeschaald als klasse 2 pathogenen. De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over het gebruik van deletiemutanten van *P. multocida* en *M. haemolytica* als vaccin. Vorig jaar heeft de COGEM wel geadviseerd over een andere vergunningaanvraag van Intervet voor een veterinaire studie met een *Rhodococcus equi* vaccin in paarden.<sup>10</sup> Ook in dit geval was er sprake van een deletiemutant. De COGEM voorzag geen nadelige effecten aan de introductie van de betreffende *R. equi* mutant in het milieu, omdat het hier een deletiemutant betrof en de bacterie al in het milieu voorkomt. De risico's voor mens en milieu verbonden aan deze studie achtte de COGEM verwaarloosbaar klein, waardoor zij positief heeft geadviseerd over deze studie.

#### **Voorgenomen werkzaamheden**

In de voorgenomen studie is de aanvrager van plan het *P. multocida* - *M. haemolytica* vaccin (PM-MH vaccin) op grote schaal te testen in kalveren. Daartoe zal het combinatievaccin maximaal vier keer subcutaan of intranasaal toegediend worden aan de kalveren, die 1 tot 16 weken oud zijn. De doseringen variëren van  $1 \times 10^5$  tot  $1 \times 10^{11}$  kolonievormende eenheden (CFU). De aanvrager wil tevens het PM-MH vaccin combineren met levend geattenuëerd *bovine respiratory syncytial virus*, *parainfluenza-3 virus* en *bovine herpesvirus 1*. De aanvrager geeft aan dat deze geattenuëerde virussen geen ggo's zijn.

De effectiviteit van het vaccin zal serologisch gevolgd worden, waarvoor bloedmonsters worden afgenomen. Tevens zullen enkele neusswabs worden genomen. Uit eerdere experimenten is duidelijk geworden dat de dieren de deletiemutanten na intranasale toediening via de neus uit zullen scheiden. Na subcutane injectie blijft het vaccin tijdelijk op de injectieplaats aanwezig maar er is door de aanvrager geen uitscheiding waargenomen. Met het oog op de beschikbare gegevens

over uitscheiding is de aanvrager niet van plan de uitscheiding opnieuw te monitoren. De gevaccineerde dieren zullen in stallen of dubbel afgerasterde weilanden worden gehouden en komen niet in aanraking met dieren die niet deelnemen aan de studie. Na afloop van het experiment zal er post-mortem onderzoek plaatsvinden op de kalveren waarna de kadavers aangeboden worden voor destructie. Voor afvoer van de mest uit de stallen acht de aanvrager het niet nodig speciale maatregelen te treffen. De mest zal zonder behandeling op het land uitgereden worden.

## **Overweging**

### ***Karakterisatie van het PM-MH vaccin***

Ten opzichte van de wildtype uitgangsstammen zijn in de vaccinstammen deleties aangebracht in het  $\DeltahyaE$  gen (*P. multocida*) en het *lktA* gen (*M. haemolytica*). De aanvrager geeft aan dat het hier schone deletiemutanten betreft. Dit betekent dat er geen coderende vectorsequenties, zoals promotors, regulatoire sequenties of antibiotica resistentie coderende sequenties in het genoom van de ggo's aanwezig is. Echter, de aanvrager heeft de moleculaire karakterisering van de vaccinstammen beperkt tot een sequentieanalyse van het gebied rond de deletie. Er worden geen gegevens getoond met betrekking tot eventuele aanwezigheid van vectorsequenties elders in het genoom. Op basis van de aangeleverde gegevens kan de COGEM niet uitsluiten dat er nog vector DNA in de vaccinstammen aanwezig is.

### ***Veiligheid van het vaccin***

Zoals eerder beschreven is de aanvrager van plan het PM-MH combinatievaccin op grote schaal te testen in kalveren. Daartoe zal het combinatievaccin maximaal vier keer subcutaan of intranasaal worden toegediend aan de kalveren, die 1 tot 16 weken oud zijn. De doseringen variëren van  $1 \times 10^5$  tot  $1 \times 10^{11}$  kolonievormende eenheden (CFU).

De aanvrager heeft verschillende studies aangeleverd waarin de veiligheid van de vaccinstammen getest is in kalveren. Zo zijn kalveren met de aparte vaccinstammen geïnoculeerd en met het combinatievaccin. Uit deze studies kwam naar voren dat een dosis van  $5 \times 10^8$  CFU *M. haemolytica* Lkt- zowel bij intranasale als subcutane toediening geen klinische bijwerkingen veroorzaakt. Kalveren die subcutaan werden geïnoculeerd met een dosis van  $5 \times 10^9$  CFU *P. multocida*  $\DeltahyaE$  ontwikkelden verschillende klinische symptomen waaronder koorts, versnelde ademhaling en lusteloosheid. Echter, deze kalveren herstelden snel zonder hiervoor behandeld te zijn. Het vaccin bleek geen nadelige effecten te veroorzaken bij een dosis van  $5 \times 10^8$  CFU.

Er is tevens een vaccinatiestudie gedaan waarbij het PM-MH combinatievaccin in verschillende doseringen via de subcutane route aan drie groepen kalveren is toegediend. Kalveren uit de eerste twee groepen kregen een dosis 2 ml met  $2,2 \times 10^8$  CFU *haemolytica* Lkt- en  $2 \times 10^7$  CFU *P. multocida*  $\DeltahyaE$  en kalveren uit de derde groep kregen een dosis van 4 ml met  $1,3 \times 10^9$  *haemolytica* Lkt- en  $1,6 \times 10^8$  CFU *P. multocida*  $\DeltahyaE$ . Daarnaast ontving de tweede groep na 21 dagen een extra dosis van  $1 \times 10^8$  CFU *haemolytica* Lkt- en  $2,8 \times 10^7$  CFU *P. multocida*  $\DeltahyaE$ . Uit deze vaccinatiestudie kwamen geen klinische bijwerkingen naar voren op een lokale zwelling van de injectieplek na.

Er zijn in de ogen van de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit als gevolg van de verschillende modificaties toeneemt. Studies hebben aangetoond dat de stammen na verschillende passages in kalveren genotypisch en fenotypisch stabiel blijven. Tevens hebben de aanvragers aangetoond dat de vaccinstammen sterk geattenuëerd zijn ten opzichte van de ouderstammen.

#### *Vaccin in combinatie met virussen*

De aanvrager zal het PM-MH vaccin als bivalent combinatievaccin gaan testen. Daarnaast wil de aanvrager het vaccin combineren met levend geattenuëerd *Bovine respiratory syncytial virus*, *Parainfluenza-3 virus* en *Bovine herpesvirus 1*. De aanvrager heeft geen additionele informatie aangeleverd betreffende de milieurisico's van dit combinatievaccin, maar geeft aan dat er geen extra milieurisico's te verwachten zijn, omdat de virussen geen genen bezitten die de bacteriële deleties zouden kunnen complementeren. Tevens bevatten de virussen geen DNA dat kan coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de biosynthese van de *Pasteurella* capsule of *Mannheimia* leukotoxine. Hoewel de combinatie van het vaccin met de genoemde levend verzwakte virussen in hoge doseringen mogelijk nadelige effecten kan hebben op het doeldier, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu op basis van bovenstaande gegevens verwaarloosbaar klein.

#### ***Effect van de vaccinstammen in niet-doelwitorganismen***

Om het effect van de vaccinstammen op niet-doelwitorganismen te onderzoeken zijn deze stammen intranasaal toegediend aan verschillende diersoorten, waaronder muizen, schapen, konijnen en kippen. Een intranasale vaccinatie van konijnen, kippen en schapen met een dosis van respectievelijk  $1,1 \times 10^9$ ,  $6,2 \times 10^8$  en  $7,0 \times 10^8$  CFU van *P. multocida*  $\Delta$ *hyaE* toont aan dat het vaccin geen nadelige effecten veroorzaakt in deze dieren. Ook in een intranasale vaccinatiestudie in schapen met een dosis van  $4,8 \times 10^9$  CFU van *M. haemolytica* Lkt- zijn geen klinische bijwerkingen waargenomen.

In de wetenschappelijke literatuur zijn enkele voorbeelden beschreven van *P. multocida* infecties bij de mens. Echter, deze infecties worden met name geassocieerd met lokale wondinfecties als gevolg van bijt- en krabwonden door honden en katten en treden vooral op in mensen met een sterk verzwakt immuunsysteem.

Met het oog op de uitkomst van deze experimenten in genoemde niet-doelwitorganismen ziet de COGEM geen reden om aan te nemen dat de vaccinstammen een nadelig effect zullen hebben op niet-doelwitorganismen.

#### ***Shedding van de vaccinstammen***

De kans dat de vaccinstammen na subcutane toediening in het milieu terecht komen is volgens de aanvragers zeer klein. Een vaccinatiestudie in kalveren met een dosis van  $7,4 \times 10^9$  CFU van *M. haemolytica* Lkt- en een studie met een dosis van  $1,3 \times 10^9$  CFU van *P. multocida*  $\Delta$ *hyaE* toonde aan dat de bacteriën tijdelijk op de injectieplaats aanwezig zijn en niet werden verspreid naar niet-gevaccineerde controle dieren. Echter, de aanvrager geeft aan dat de vaccinstammen na intranasale toediening over langere tijd kunnen worden uitgescheiden. Een studie waarbij stam *M.*

*haemolytica* Lkt- in een dosis van  $5 \times 10^8$  intranasaal aan kalveren werd toegediend toonde aan dat deze stam nog enige dagen na vaccinatie aanwezig blijft in de bovenste luchtwegen en via niezen of neuscontact uitgescheiden kan worden in het milieu.

De COGEM merkt op dat er geen sheddingstudies zijn verricht met de voorgestelde maximale dosering van  $1 \times 10^{11}$  CFU. Een dergelijke hoge dosering zou kunnen leiden tot langere of verhoogde shedding. Tevens zijn er geen sheddingstudies verricht met het vaccin in combinatie met de levend verzwakte virussen. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans op uitscheiding van de vaccinstammen aanwezig.

#### *Overleving van de vaccinstam in het milieu*

Om inzicht te verkrijgen in de stabiliteit van de vaccinstam in het milieu heeft de aanvrager de persistentie van de vaccinstammen onder verschillende omstandigheden in aarde en in water onderzocht. Omdat de bacteriën geen sporen vormen, kunnen zij slechts beperkte tijd overleven in het milieu. Studies hebben aangetoond dat *P. multocida*  $\Delta$ *hyaE* niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25°C. 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°C. Op grond van deze gegevens is de COGEM van mening dat de vaccinstammen een beperkte overlevingskans hebben in het milieu. De COGEM merkt echter op dat er geen vergelijkingen zijn gedaan met de wildtype stammen, waardoor niet is aangetoond of de vaccinstammen korter of langer in het milieu aanwezig zijn.

#### *Reversie naar volvirulente stam*

Bacteriën wisselen van nature continu genetische informatie uit. Aangezien de wildtype stammen algemeen voorkomen in de natuur, is het waarschijnlijk dat de vaccinstam bij introductie in het milieu in contact zal komen met het wildtype. Hoewel de COGEM de kans zeer klein acht, dat de deleties van de betreffende genen ongedaan worden gemaakt, kan zij niet uitsluiten dat door recombinatie de *hyaE* en *lktA* genen op den duur weer in het genoom van de vaccinstam worden geïncorporeerd. Onder voorwaarde dat de vaccinstammen geen vector DNA bevatten, zal dit in het ergste geval kunnen leiden tot het ontstaan van het uitgangsorganisme. Omdat de uitgangsorganismen algemeen voorkomen in het milieu, acht de COGEM de risico's van mogelijke reversie verwaarloosbaar klein.

#### **Conclusie**

De *P. multocida*  $\Delta$ *hyaE* en *M. haemolytica* Lkt- vaccinstammen zijn deletiemutanten van *P. multocida* uitgangsstam NADC-1062 en *M. haemolytica* uitgangsstam NADC-D153. *P. multocida*  $\Delta$ *hyaE* mist een deel van het *hyaE* gen waardoor de bacterie geen capsule meer vormt. *M. haemolytica* Lkt- mist een deel van het *lktA* gen waardoor het geen leukotoxine meer produceert. Op basis van de overgelegde gegevens is de COGEM van mening dat het stammen betreft met een verminderde pathogeniteit voor kalveren. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat de vaccinstammen pathogeen zullen zijn voor niet-doelwitorganismen inclusief de mens.

Hoewel de kans op uitscheiding van de vaccinstammen bij intranasale toediening aanwezig is, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij uitscheiding verwaarloosbaar klein, aangezien het verzwakte stammen betreft en de uitgangsgenorganismen algemeen voorkomen in het milieu. Onder de geteste condities is de COGEM van mening dat de vaccinstammen een beperkte overleving hebben in de natuur.

De aanvrager heeft de moleculaire karakterisering van de vaccinstammen beperkt tot een sequentieanalyse van het gebied rond de deletie. Er zijn geen gegevens geleverd met betrekking tot eventuele aanwezigheid van vectorsequenties elders in het genoom. Op basis van de aangeleverde informatie over de moleculaire karakterisatie kan de COGEM niet concluderen dat het hier schone deletiemutanten betreft. Om die reden kan de COGEM op dit moment niet positief adviseren over de voorgenomen vaccinatiestudie.

## Referenties

1. Ames *et al.* (1984). Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* en *Pasteurella Multocida*. *Can J Comp Med.* 49: 395-400
2. Davies *et al.* (2005). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet Microbiol.* 99: 145-58
3. Ackermann MR & Brogden KA (2000). Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes Infect.* 2: 1079-88
- 4 Ewers *et al.* (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol.* 114: 304-17
5. Boyce *et al.* (2000) *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol.* Sep 29: 153-60
6. Christidou *et al.* (2005). Review of *Pasteurella multocida* infections over a twelve-year period in a tertiary care hospital. *Am J Infect Dis.* 1: 107-10
7. Shewen & Wilkie (1981). Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun.* 35: 91-4
8. Baluyut *et al.* (1981) Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am J Vet Res.* 42: 1920-6
9. Clinkenbeard KD & Upton ML (1991). Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am J Vet Res.* 52: 453-7
10. COGEM 2010. Veterinaire studie naar *Rhodococcus equi* vaccin in paarden. Advies CGM/100708-01