

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

DATUM 16 april 2012
KENMERK CGM/120416-01
ONDERWERP Advies: Aanvullende informatie over veterinaire studie met PM-MH vaccin

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van de adviesvraag over aanvullende informatie bij 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.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over aanvullende informatie bij een vergunningaanvraag voor 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 gg-bacteriestammen als combinatievaccin te testen in kalveren en verzoekt een vergunning voor de introductie in het milieu van dit combinatievaccin.

De COGEM heeft al eerder geadviseerd over de milieurisico's van deze veterinaire studie. In dit advies heeft de COGEM aangegeven dat zij de gg-bacteriestammen ten opzichte van de uitgangsstammen verminderd pathogeen acht voor kalveren. Tevens zag zij geen reden om aan te nemen dat de vaccinstammen pathogeen zijn voor andere diersoorten of de mens. Op basis van de aangeleverde informatie over de moleculaire karakterisering kon de COGEM echter niet concluderen dat de gg-bacteriestammen vrij zijn van plasmide DNA, dat gebruikt is om deze stammen te maken. Hierdoor kon zij niet instemmen met de voorgenomen vaccinatiestudie.

Naar aanleiding van het genoemde COGEM advies heeft de aanvrager het genoom van beide gg-bacteriestammen nader in kaart gebracht en geanalyseerd op het voorkomen van plasmide DNA in beide genomen. De COGEM is van mening dat door de gevolgde sequentieanalyse het genoom in voldoende detail is onderzocht. Op basis van de aangeleverde informatie concludeert de COGEM dat er tijdens de ontwikkeling van de gg-bacteriestammen geen plasmide DNA in het genoom terecht is gekomen.

Gebaseerd op deze conclusie en de uitkomst van de milieurisicoanalyse zoals vermeld in het eerdere COGEM advies over deze veterinaire studie, is de COGEM van mening dat de risico's verbonden aan de introductie in het milieu van beide gg-bacteriestammen verwaarloosbaar klein zijn.

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

Aanvullende informatie over veterinaire studie met *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* deletiemutanten

COGEM advies CGM/120416-01

Inleiding

Intervet International BV heeft een zogenaamd combinatievaccin ontwikkeld tegen *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* infecties en wil dit testen in kalveren. Het combinatievaccin bestaat uit deletiemutanten van beide stammen, waaruit enkele virulentiegenen zijn verwijderd. Nadat de COGEM afgelopen jaar negatief heeft geadviseerd over deze vergunningaanvraag heeft de aanvrager aanvullende informatie aangeleverd. De COGEM is gevraagd deze aanvullende informatie te beoordelen en opnieuw te adviseren over de eventuele milieurisico's van de introductie in het milieu van dit combinatievaccin.

Belangrijke aspecten van het vaccin

De virulentie van *P. multocida* wordt in belangrijke mate bepaald door de aanwezigheid van een capsule die de bacterie helpt om fagocytose en complement-gemedieerde inactivatie tegen te gaan en zo de immuunrespons te ontwijken.¹ De capsule van deze bacterie bestaat uit twee polysaccharide monomeren, die worden geproduceerd onder invloed van de genen *hyaE*, *hyaD*, *hyaC*, *hyaB* en *hyaA*. De deletiemutant van de *P. multocida* bacteriestam die de aanvrager voor het te testen vaccin heeft ontwikkeld, mist een deel van het *hyaE* gen. Hierdoor bezit het resulterende genetisch gemodificeerde organisme (ggo) geen capsule.

Van de potentiële virulentiefactoren van *M. haemolytica* speelt het leukotoxine een zeer belangrijke rol in de pathogenese van deze bacterie. Het leukotoxine lyseert de leukocyten en bloedplaatjes van herkauwers en vermindert hierdoor o.a. de afweerreactie.^{2,3,4} Het leukotoxine wordt gevormd onder invloed van vier genen: *lktA*, *lktC*, *lktB* en *lktD*. Van deze genen codeert het *lktA* daadwerkelijk voor het toxine. Voor het vaccin heeft de aanvrager een deletiemutant gemaakt die een deel van het *lktA* gen mist.

De 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. De aanvrager wil tevens het PM-MH vaccin combineren met levend geattenuerd *Bovine respiratory syncytial virus*, *Parainfluenza-3 virus* en *Bovine herpesvirus 1*. De aanvrager geeft aan dat deze geattenueerde virussen geen ggo's zijn.

De effectiviteit van het vaccin zal serologisch gevolgd worden, waarvoor bloedmonsters worden afgenomen. Tevens zullen enkele neusswabs worden genomen. 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.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft al eerder geadviseerd over de aanvraag voor deze vaccinatiestudie.⁵ Op basis van de aangeleverde informatie was de COGEM van mening dat de deletiemutanten van *P. multocida* en *M. haemolytica* verminderd pathogeen zijn voor kalveren. Tevens had zij geen reden om aan te nemen dat de vaccinstammen pathogeen zullen zijn voor niet-doelwitorganismen inclusief de mens. Gebaseerd op eerdere ervaringen met intranasale toediening achtte de COGEM de kans op uitscheiding van de vaccinstammen aanwezig. Gezien de gegevens over de verminderde pathogeniteit was de COGEM echter van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitscheiding verwaarloosbaar klein zijn.

Deze conclusie was gebaseerd op de aanname dat de betreffende vaccinstammen schone deletiemutanten zijn, die tijdens de ontwikkeling geen vectorsequenties hebben ingebouwd. Voor de moleculaire karakterisering van de deletiemutanten heeft de aanvrager een sequentieanalyse van het gebied rond de deletie uitgevoerd. Er waren destijds echter geen gegevens aangeleverd met betrekking tot eventuele onbedoelde aanwezigheid van vectorsequenties elders in het genoom. Op basis van deze beperkte moleculaire karakterisering kon de COGEM niet uitsluiten dat er nog plasmide DNA in de vaccinstammen aanwezig is. Dit heeft ertoe geleid dat de COGEM op dat moment niet positief kon adviseren over de vaccinatiestudie.

Aanvullende informatie

Met het oog op bovenstaand COGEM advies heeft de aanvrager aanvullende informatie aangeleverd om de afwezigheid van plasmide DNA in de deletiemutanten nader te onderbouwen. Daartoe is het genoom van beide deletiemutanten gesequenced en zijn de verkregen sequenties onderzocht op sequentieovereenkomst met twee specifieke fragmenten van de plasmiden, die zijn gebruikt om de betreffende vaccinstammen te maken. Het ene fragment omvat het zogenaamde 'origin of replication' (ori) en is 1,2 kilobasen groot. Het andere fragment betreft het kanamycine resistentie gen (Kan^R) en beslaat 1,3 kilobasen. Als positieve controle zijn twee fragmenten gebruikt die in geval van *P. multocida* \DeltahyaA stroomopwaarts en stroomafwaarts van het *hyaE* gen zijn gepositioneerd en in geval van *M. haemolytica* Lkt- stroomopwaarts en stroomafwaarts van het gedeeltelijk verwijderde *lktA* gen liggen.

Op basis van de lengte van de verkregen sequenties leidt de aanvrager af dat het genoom van *P. multocida* \DeltahyaA in theorie 41 maal is gesequenced en het genoom van *M. haemolytica* Lkt- 46 maal. De sequenties zijn niet samengevoegd tot een representatie van het gehele genoom. Uit de analyse van de sequenties blijkt dat de fragmenten van de ori en de Kan^R niet in het genoom van hetzij *P. multocida* \DeltahyaA als *M. haemolytica* Lkt- aanwezig zijn. De positieve controles werden daarentegen meerdere malen aangetroffen in de verkregen sequenties van het genoom van beide deletiemutanten.

Overweging

Zoals in de aanvullende informatie is voorgerekend, is het genoom van *P. multocida* Δ hyaA en *M. haemolytica* Lkt- in zijn geheel respectievelijk 41 en 46 maal gesequenced. Om er zeker van te kunnen zijn dat de sequentieanalyse daadwerkelijk het gehele genoom beslaat en een goed beeld geeft van de sequentie van het genoom van de deletiemutanten acht de COGEM het van belang dat het genoom meerdere malen in zijn geheel is gesequenced. Door de gegeven 41 en 46 maal wordt hier volgens de COGEM ruimschoots aan voldaan.

De aanvrager heeft de verkregen sequenties van het genoom van iedere deletiemutant vervolgens gecontroleerd op de aanwezigheid van twee belangrijke delen (ori en Kan^R) van het plasmide dat gebruikt is bij de constructie van deze deletiemutanten. De sequentie van deze delen werd niet aangetroffen. De waarde van deze uitkomst is afhankelijk van de analyse van de positieve controles. De aanvrager heeft als positieve controle de verkregen sequenties van het genoom van iedere deletiemutant gecontroleerd op de aanwezigheid van twee specifieke domeinen. De positieve controles voor *P. multocida* Δ hyaA worden gezamenlijk 116 keer aangetroffen. De positieve controles voor *M. haemolytica* Lkt- worden gezamenlijk 383 maal aangetroffen. Op basis van deze aantallen concludeert de COGEM dat de sequentie van het ori domein of het Kan^R gen niet aanwezig is in de deletiemutanten.

Conclusie

Op basis van bovenstaande overweging over de aanvullende informatie acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de deletiemutanten sequenties bevatten van het plasmide, waarmee deze mutanten zijn gemaakt. Derhalve concludeert zij dat *P. multocida* Δ hyaA en *M. haemolytica* Lkt-zogenaamde schone deletiemutanten zijn. Gebaseerd op deze conclusie en de milieurisicoanalyse die de COGEM in haar eerdere advies over betreffende vergunningaanvraag uiteen heeft gezet, acht de COGEM de milieurisico's verbonden aan deze veterinaire studie verwaarloosbaar klein. Concluderend heeft de COGEM geen bezwaar tegen de voorgenomen vaccinatiestudie.

Referenties

- 1 Boyce *et al.* (2000). *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol.* Sep 29: 153-60
- 2 Shewen & Wilkie (1981). Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun.* 35: 91-4
- 3 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
- 4 Clinkenbeard KD & Upton ML (1991). Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am J Vet Res.* 52: 453-7
- 5 COGEM (2011). Introductie in het milieu van *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* deletiemutanten. Advies CGM/110804-01