

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 15 januari 2016
KENMERK CGM/160115-01
ONDERWERP Advies classificatie en inschaling werkzaamheden visparasieten

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de classificatie van twee visparasieten en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde mutanten van deze parasieten deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de visparasieten *Trypanoplasma borreli* en *Trypanosoma carassii* en daarbij aan te geven of deze parasieten strikt dierpathogeen zijn. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) mutanten van deze parasieten. De gg-parasieten zijn voorzien van een plasmide met marker genen. In het plasmide zijn geen sequenties aanwezig die coderen voor een schadelijk genproduct.

Gebaseerd op de aard van de ziekte die *T. borreli* en *T. carassii* veroorzaken, en gezien het feit dat beide parasieten niet pathogeen zijn voor de mens, hun verspreiding afhankelijk is van transmissievector (bloedzuigers), de parasieten en vectoren enzoëtisch zijn, en er populatie-immuniteit onder vissen aanwezig is, adviseert de COGEM *T. borreli* en *T. carassii* als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Aangezien beide parasieten niet buiten hun gastheren kunnen overleven, acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd, indien laboratoriumwerkzaamheden met gg- *T. borreli* en gg- *T. carassii* op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd worden.

Onder de voorwaarde dat er geen bloedzuigers aanwezig zullen zijn, adviseert de COGEM de werkzaamheden met de gg-parasieten in combinatie met vissen uit te voeren op DM-I inperkingsniveau met inachtneming van het aanvullende doelvoorschrift, dat de introductie van met gg-parasieten besmette vissen in het riool tegengaat. Onder voornoemde voorwaarden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden met gg- *T. borreli* en gg-*T. carassii* 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 series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. F.H.M. Borgsteede, veterinaire parasitoloog

Classificatie en inschaling werkzaamheden visparasieten *Trypanoplasma borreli* en *Trypanosoma carassii*

COGEM advies CGM/160115-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de visparasieten *Trypanoplasma borreli* en *Trypanosoma carassii* en daarbij aan te geven of deze parasieten strikt dierpathogeen zijn. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) mutanten van deze parasieten.

Het betreft een vergunningsaanvraag ingediend door de 'Animal Science Group' van de Wageningen Universiteit. De aanvrager is van plan de interactie tussen de immuuncellen van de gastheer (karper, zebravis) en de parasieten te bestuderen.

1.1 Parasieten

Parasieten zijn organismen die zich voor het volbrengen van hun natuurlijke ontwikkelingscyclus voeden ten koste van een ander organisme én zich daarbij tijdelijk of permanent in of op hun gastheer vestigen. Parasieten zijn eukaryotische organismen en worden, naast morfologische kenmerken, ook onderscheiden op basis van de manier waarop de interactie tussen gastheer en parasiet plaatsvindt.^{1,2}

Een parasiet doorloopt een aantal fasen in zijn ontwikkeling voordat hij het volwassen stadium bereikt. Deze ontwikkelingsstadia kunnen morfologisch heel verschillend zijn. Er bestaan parasieten die maar één gastheersoort parasiteren (directe levenscyclus), en parasieten die gebruik maken van één of meerdere tussengastheren (indirecte levenscyclus). Bij een aantal parasietensoorten kan in de tussengastheer ongeslachtelijke vermenigvuldiging plaatsvinden. In de eindgastheer ontwikkelt de parasiet zich tot het volwassen stadium en vindt al dan niet geslachtelijke vermenigvuldiging plaats. Vectoren kunnen bijdragen aan de verspreiding van parasieten.^{1,2}

1.2 *T. borreli* en *T. carassii*

T. borreli en *T. carassii* zijn éencelligen en behoren tot de orde van de Kinetoplastida, maar tot verschillende taxonomische families.^{2,3} De parasieten infecteren goudvissen, koikarpers en andere karperachtigen.^{2,4,5} Daarnaast is *T. carassii* ook in staat enkele niet-karperachtige zoetwatervissen te infecteren.⁵ Ook menginfecties met *T. borreli* en *T. carassii* worden waargenomen.⁵ Beide parasieten komen algemeen in Europa voor.^{5,6}

De door de parasieten veroorzaakte infecties zijn doorgaans mild en langdurig van aard, en kunnen latent aanwezig zijn.^{5,6,7} De parasieten leven extracellulair in bloed en weefsels, en veroorzaken bloedarmoede en gewichtsverlies wat zich onder meer uit als de zogenaamde 'vissenslaapziekte'. Bij sommige vissen gaat de infectie gepaard met hoge aantallen parasieten in het bloed wat de dood tot gevolg kan hebben. Dergelijke parasitaemieën zijn onder meer waargenomen bij inteeltkarperlijnen.^{2,5,7,8,9} Daarnaast is deze infectiegevoeligheid gerelateerd aan de conditie van het immuunsysteem en de leeftijd van de vis.^{6,10}

De transmissie en verspreiding van beide parasieten vinden plaats via de specifieke bloedzuiger-soorten *Hemiclepsis marginata* en *Piscicola geometra*.^{2,11} *T. borreli* kan in de bloedzuiger een aantal ontwikkelingsstadia doorlopen, maar alleen als er vissenbloed aanwezig is.¹¹ Beide bloedzuigers komen algemeen voor in Nederland.¹²

Onder specifieke laboratoriumomstandigheden is het mogelijk *T. borreli* en *T. carassii* buiten hun gastheer te kweken. Hiervoor zijn speciale media nodig.^{13,14} Voor het behoud van hun infectiviteit is daarbij de aanwezigheid van karperbloed of -serum tijdens de kweek noodzakelijk.^{13,14,15} Daarnaast kunnen de parasieten *in vivo* in kweek gehouden worden door deze intraperitoneaal of intramusculair in karperachtigen te injecteren.^{6,11,14}

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder over de parasieten *T. borreli* en *T. carassii* geadviseerd. Wel heeft zij in 2012 advies uitgebracht over de parasiet *Trypanosoma brucei brucei*. Deze parasiet is niet pathogeen voor de mens, maar wel ernstig pathogeen voor bepaalde zoogdiersoorten. In tegenstelling tot *T. borreli* en *T. carassii*, is *T. brucei brucei* een intracellulaire parasiet.¹³ De transmissie van *T. brucei brucei* vindt plaats via de tsetsevlieg, waarbij de vlieg transmissievector is, en het zoogdier eindgastheer. De COGEM heeft geadviseerd *T. brucei brucei* in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.¹⁶

3. Classificaties door andere beoordelende instanties

Deze instantie neemt pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw. Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN) heeft *T. borreli* ingedeeld als een dierpathogeen behorende tot risicogroep 2.¹⁷ Door de American Type Culture Collection (ATCC) wordt, gebaseerd op pathogeniteit voor de mens, *T. borreli* aangeduid als biosafety level 1.¹⁸ Door het Duitse 'Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit' (voorheen ZKBS) is *T. carassii* ingedeeld in risicoklasse 2.¹⁹

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil de immunreactie van karper en zebravis op infecties met *T. borreli* of *T. carassii* onderzoeken. Hij zal daartoe de parasieten transfacteren met plasmide p3605. Dit plasmide is 5892 basenparen groot en bevat onder meer tubuline en actine inter-ORF sequenties. Tubuline en actine zijn eiwitten die aanwezig zijn in het cytoskelet van eukaryotische cellen. Daarnaast zijn een blasticine-resistentiemarker en verschillende fluorescerende reporter genen afkomstig van kwallen in het plasmide ingebracht. De aanvrager geeft aan dat p3605 geen sequenties bevat die coderen voor een schadelijk genproduct.

Voor de *in vivo* experimenten zullen karper en zebravis met de gg-parasieten geïnfecteerd worden. Het infecteren zal alleen via injectie plaatsvinden, niet via bloedzuigers.

5. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door

apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant,
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen,
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie,
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

6. Classificatie dierpathogenen

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.²⁰ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt:

Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.

De overweging die de COGEM hanteert om strikt dierpathogenen te classificeren, wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.²¹ De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

7. Overwegingen en advies

7.1 Classificatie *T. borreli* en *T. carassii*

T. borreli en *T. carassii* zijn pathogeen voor karperachtigen. *T. carassii* is daarnaast pathogeen voor een beperkt aantal andere vissoorten. In de literatuur wordt geen melding gemaakt dat *T. borreli* en *T. carassii* pathogeen zijn voor de mens.²² Ook bij de COGEM is niet bekend dat deze parasieten ziekte bij de mens kunnen veroorzaken. Om deze redenen beschouwt de COGEM *T. borreli* en *T. carassii* als strikt dierpathogenen.

Beide parasieten veroorzaken doorgaans een mild ziektebeeld. In de beschikbare wetenschappelijke literatuur is nooit melding gemaakt dat de parasieten ernstige ziekte bij natuurlijke vispopulaties veroorzaken. Binnen de aquacultuur zijn bij enkele karperachtigen (onder meer inteeltlijnen, jonge vissen en vissen met een verzwakte weerstand) infecties met een hoge mortaliteit gerapporteerd. Deze infecties zijn gerelateerd aan een niet goed werkend immuunsysteem.

T. borreli en *T. carassii* zijn enzoötisch, en populatie-immuniteit tegen de door deze parasieten veroorzaakte infecties is aanwezig. De transmissievector van beide parasieten zijn bepaalde soorten bloedzuigers die algemeen in Nederland voorkomen. Voor zover bij de COGEM bekend is er nooit gerapporteerd dat de parasieten in oppervlaktewater kunnen overleven, of dat zij rechtstreeks via het water of door middel van verticale transmissie overgedragen kunnen worden. Er zijn geen geneesmiddelen tegen *T. borreli* en *T. carassii* infecties voorradig. Echter, besmetting met de parasieten in de commerciële aquacultuur kan voorkomen worden door de transmissievector te verwijderen.⁸

Op basis van de hierboven genoemde eigenschappen adviseert de COGEM *T. borreli* en *T. carassii* als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

7.2 Inschaling werkzaamheden met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii*

De aanvrager is van plan *T. borreli* en *T. carassii* te transfecteren met een plasmide voorzien van markergenen. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat deze genetische modificatie van invloed is op de pathogeniteit, de groei en vermenigvuldiging, en de wijze van verspreiding van deze parasieten.

7.2.1 Laboratoriumwerkzaamheden met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii*

T. borreli en *T. carassii* zijn niet pathogeen voor de mens. Beide parasieten kunnen niet buiten hun gastheer (vis) en transmissievector (bloedzuiger) overleven. Indien tijdens de transfectie van *T. borreli* en *T. carassii* gg-parasieten onbedoeld direct in het milieu terecht zouden komen, bijvoorbeeld via het riool, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de gg-parasieten dit overleven. De COGEM is daarom van mening dat de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd is, indien *in vitro* laboratoriumwerkzaamheden met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii* plaats vinden op ML-I inperkingsniveau.

7.2.2 Infecteren van vissen met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii*

De aanvrager geeft aan dat de vissen door middel van injecties met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii* geïnfecteerd zullen worden en dat er tijdens de experimenten geen bloedzuigers aanwezig zijn. Er zijn bij de COGEM geen gegevens bekend dat *T. borreli* en *T. carassii* door besmette vissen uitgescheiden kunnen worden, zoals via uitwerpselen, eitjes of sperma.

In theorie kunnen tijdens de voorgenomen werkzaamheden de gg-parasieten door middel van de besmette vissen (karpers of zebravis) onbedoeld via het riool in het milieu terecht komen. De COGEM acht de kans echter zeer klein dat deze vissen - inclusief de gg-parasieten - in dat geval de condities in het riool of waterzuiveringsinstallaties zullen overleven. Op basis van deze overwegingen adviseert de COGEM de voorgenomen *in vivo* werkzaamheden op DM-I inperkingsniveau uit te voeren. Om de kans op onbedoelde ontsnapping van besmette vissen te minimaliseren, adviseert zij aanvullend inperkende maatregelen in acht te nemen bij lozing van aquariumwater op het riool, bijvoorbeeld door afvoerbuizen en -putjes die aangesloten zijn op het riool, te voorzien van gaas zodanig dat passage van karpers en zebravissen onmogelijk is. Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van het aanvullende doelvoorschrift, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij werkzaamheden met gg-*T. borreli* en gg-*T. carassii* in combinatie met vissen verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Nederlandse Vereniging voor Parasitologie. www.parasitologie.nl/index.php?id=7 (bezocht 21 december 2015)
2. The encyclopaedia of parasitology (2008). 3rd Edition. Ed. Mehlhorn H, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York
3. Simpson AG *et al.* (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 22: 168-174
4. Sadava D *et al.* (2014). In 'Life: The science of biology. 10th Edition. Ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA
5. Lom J & Dyková I (1992). Protozoan parasites of fishes. Amsterdam, Elsevier.
6. Scharsack JP *et al.* (2004). Some immune parameters in carp *Cyprinus carpio* susceptible and resistant to the haemoflagellate *Trypanoplasma borreli*. Dis. Aquat. Org. 60: 41-48

7. Woo PTK & Ardelli BF (2014). Immunity against selected piscine flagellates. *Devel. Comp. Immunol.* 43: 268-279
8. Noga EJ (2011). *Fish disease: Diagnosis and treatment*, 2nd Edition. John Wiley & Sons
https://books.google.nl/books/about/Fish_Disease.html?id=M5GZGH3W-IEC&hl=nl (bezocht: 21 december 2015)
9. Wiegertjes GF *et al.* (1995). Genetic variation in susceptibility to *Trypanoplasma borreli* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47: 153-161
10. Scharsack JP (2001). Characterization of immune responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) to the hemoflagellate *Trypanoplasma borreli* Laveran and Mesnil, 1901. Dissertation 'Doktors der Naturwissenschaften Universität Hannover'
11. Kruse P *et al.* (1989). Development of *Trypanoplasma borreli* (Mastigophora: Kinetoplastida) in the leech vector *Piscicola geometra* and its infectivity for the common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Parasitol.* 75: 527-530
12. Van Haaren T. *et al.* (2004). The freshwater leeches (*Hirudinea*) of The Netherlands. *Lauterbornia* 52: 113-131
13. Overath P *et al.* (1998). Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma carassii*, a common parasite of freshwater fish. *Parasitol. Res.* 84: 343-347
14. Steinhagen D *et al.* (2000). *In vitro* cultivation of *Trypanoplasma borreli* (Protozoa: Kinetoplastida), a parasite from the blood of common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.* 41: 195-201
15. Peckova H & Lom J (1990). Growth, morphology and division of flagellates of the genus *Trypanoplasma* (Protozoa, Kinetoplastida) *in vitro*. *Parasitol. Res.* 76: 553-558
16. COGEM (2012). Classificatie humaan- en dierpathogene parasieten. Advies CGM/120127-01
17. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 3: Parasites. Status January 2013. www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezocht: 22 december 2015)
18. American Type Culture Collection. http://www.jgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Protozoa/Parasitic_Protzoa.aspx (bezocht 22 december 2015)
19. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html (bezocht: 22 december 2015)
20. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
21. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
22. Ashford RW & Crewe W (2003). *The parasites of Homo sapiens*, an annotated checklist of the protozoa, helminths and arthropods for which we are home. 2nd Edition. Taylor & Francis Group, London