

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

**DATUM** 17 maart 2016  
**KENMERK** CGM/160317-01  
**ONDERWERP** Advies: Aanvullend advies over een veterinaire studie met een kippenvaccin

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van aanvullende gegevens betreffende de aanvraag IM-MV 15-011 met de titel 'Vaccination of chickens with a herpesvirus of turkey vaccine with inserted the F-gene of *Newcastle disease virus* and the VP2 gene of *Infectious bursal disease virus*', van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

Op 20 januari 2016 heeft de COGEM advies uitgebracht over een vergunningaanvraag betreffende een veldstudie met het recombinant kippenvaccin HVT-ND-IBD. Het vaccin is ontwikkeld om pluimvee te beschermen tegen de ziekte van Marek, Newcastle Disease en Infectious Bursal Disease. Het vaccin bestaat uit genetisch gemodificeerd *Meleagrid herpesvirus 1* waarin onder meer de genen VP2 uit *Infectious bursal disease virus* en F uit *Newcastle disease virus* aanwezig zijn. In haar advies concludeerde de COGEM dat het dossier onvolledig was, omdat bepaalde onderbouwende gegevens ontbraken.

De aanvrager heeft aanvullende informatie aangeleverd over de moleculaire karakterisering en het tropisme van het vaccin. De COGEM is gevraagd deze informatie te beoordelen en opnieuw te adviseren over de eventuele milieurisico's van de voorgenomen veldstudie.

De nieuwe gegevens nemen het eerdere voorbehoud van de COGEM weg. De COGEM is daarom van mening dat de milieurisico's bij veldproef met HVT-ND-IBD verwaarloosbaar klein zijn wanneer de eerder voorgestelde managementmaatregelen in acht worden genomen.

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

Hoogachtend,



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

*Met het oog op eventuele belangenverstremeling zijn de COGEM leden dr. T. Boekhout en dr. D. Goovaerts niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Aanvullend advies over een veterinaire studie met een kippenvaccin

## COGEM advies CGM/160317-01

### Inleiding

Op 20 januari 2016 heeft de COGEM advies uitgebracht over de introductie in het milieu van het recombinant kippenvaccin HVT-ND-IBD.<sup>1</sup> Het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) HVT-ND-IBD is ontwikkeld om pluimvee (voornamelijk kippen) te beschermen tegen de ziekte van Marek (MD), Newcastle Disease (ND) en Infectious Bursal Disease (IBD). Het ggo bestaat uit *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1) waarin de genen VP2 uit *Infectious bursal disease virus* en F uit *Newcastle disease virus* ingebracht zijn.

In haar advies concludeerde de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen veldstudie vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn. Het dossier was echter onvolledig omdat bepaalde onderbouwende gegevens over de moleculaire karakterisering en het tropisme ontbraken. De COGEM achtte aanlevering van aanvullende informatie noodzakelijk voordat zij tot een definitief eindoordeel kan komen.

Naar aanleiding van het advies heeft de aanvrager aanvullende informatie aangeleverd. De COGEM is gevraagd deze informatie te beoordelen en opnieuw te adviseren over de eventuele milieurisico's van de voorgenomen veldstudie.

### Voorgaande COGEM advies bij vergunningaanvraag

In haar onlangs afgegeven advies betreffende de introductie in het milieu van HVT-ND-IBD stelde de COGEM dat bepaalde gegevens over de moleculaire karakterisering en het tropisme van het virus ontbraken.<sup>1</sup> De COGEM achtte aanlevering van deze aanvullende informatie betreffende de moleculaire karakterisering en het tropisme noodzakelijk om tot een eindoordeel te kunnen komen.

De aanvrager had een sequentieanalyse uitgevoerd om de sequenties te bepalen van de ingebrachte expressiecassettes voor het VP2 van *Infectious bursal disease virus* en het F van *Newcastle disease virus*. Als aanvulling op de moleculaire karakterisering achtte de COGEM een sequentieanalyse van het complete insert en de recombinatiesequenties met overgangen in het ouderorganisme noodzakelijk.

Het tropisme van HVT-ND-IBD had de aanvrager bepaald door weefsels van geïnfecteerde kippen te onderzoeken. Hierbij waren alleen weefsels onderzocht waarin normaal gesproken een infectie met MeHV-1 aangetoond kan worden. De COGEM was van mening dat resultaten in andere weefsels meer inzicht bieden in mogelijke tropismeveranderingen. De COGEM wees erop dat hiervoor ook andere studies ter ondersteuning kunnen dienen, zoals een studie met een MeHV-1 vaccin dat het F eiwit van NDV bevat en een studie met een MeHV-1 vaccin dat het VP2 eiwit van IBDV bevat.

## **Overwegingen**

### ***Moleculaire karakterisering***

Bij de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde (gg-) virussen acht de COGEM het voor de milieurisico-analyse van belang dat de genetische samenstelling van een recombinant virus in voldoende detail moleculair is gekarakteriseerd en dat overtuigend bewijs hiervan wordt overlegd. Op basis van deze informatie kan vastgesteld worden of het genetisch gemodificeerde organisme overeenkomt met zijn theoretische beschrijving. De COGEM is daarom van mening dat vastgesteld dient te worden op welke locatie en welke oriëntatie het insert is geïntegreerd, en hoeveel kopieën van het insert aanwezig zijn. Om hier inzicht in te krijgen is de COGEM van mening dat de insertie volledig gesequenced dient te worden. Deze sequentieanalyse dient het insert met eventueel gebruikte recombinatiesequenties te omvatten en dient aan weerszijden van het insert enkele tientallen nucleotiden door te lopen in het genoom van het acceptororganisme. De nucleotidenvolgorde van insert en genoemde flankerende regionen dient in de aanvraag opgenomen te worden.<sup>2</sup>

De door de aanvrager aangeleverde aanvullende informatie bestaat uit een sequentieanalyse van de overgangen van de recombinatiesequenties en het ouderorganisme. De sequenties zijn vergeleken met MeHV-1 sequenties uit Genbank (AF291866 en X68653). De resultaten laten zien dat er 100% homologie is tussen de recombinatiesequenties en de sequenties van het ouderorganisme. Hieruit concludeert de aanvrager dat er geen veranderingen zijn opgetreden in de HVT sequentie van de HVT-ND-IBD ten opzichten van het ouderorganisme.

De COGEM constateert dat de aanvrager de sequentie van de expressiecassettes van VP2 en F en de sequentie van de overgangen aan weerszijden van de insertieplaats heeft bepaald. Een deel van de recombinatiesequenties die tussen de expressiecassettes en de overgang tussen insert en acceptororganisme liggen, ontbreken echter. Feitelijk gezien heeft de aanvrager hiermee niet voldaan aan de eerder geadviseerde richtlijn van de COGEM.

De COGEM merkt echter op dat met de aangeleverde sequentieanalyse en de eerdere overlegde Southern blot analyses voldoende moleculaire informatie wordt gegeven om de locatie, de oriëntatie en het aantal kopieën van het insert in het ggo af te kunnen leiden. Zij voegt hieraan toe dat de grootte van het insert overeenkomt met de verwachte grootte. Hierdoor zijn grote wijzigingen in de recombinatiegebieden waarvan de sequentie niet is bepaald, onwaarschijnlijk en zijn eventueel aanwezige afwijkingen beperkt tot puntmutaties. Aangezien het insert door homologe recombinatie in het ggo is gebracht, acht de COGEM de kans klein dat in betreffende gebieden puntmutaties zijn ontstaan. Bovendien acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat eventuele puntmutaties in dit gebied de eigenschappen van het ggo dusdanig veranderen dat dit tot een milieurisico zal leiden. Gebaseerd op deze overweging is de COGEM van mening dat het ggo door de aanvullende informatie afdoende moleculair in kaart gebracht is.

### ***Tropisme van HVT-ND-IBD***

In HVT-ND-IBD zijn de expressiecassettes van VP2 van IBDV en F van NDV aanwezig. Doordat in het kippenvaccin eiwitten uit andere virussen tot expressie gebracht worden, kan er mogelijk een verandering van het tropisme van het uitgangsvirus plaatsvinden.

De aanvrager heeft een drietal studies aangeleverd waarin het tropisme van aan HVT-ND-IBD verwante virussen beschreven zijn. In de eerste twee studies is het tropisme beschreven van MeHV-1 virussen die het F uit NDV tot expressie brengen (Innovax-ND en Vectormune-ND). In de derde studie levert de aanvrager informatie aan over het tropisme van een MeHV-1 virus die het VP2 van IBDV tot expressie brengt (Vaxxitek HVT+IBD).

In de eerste studie wordt de aanwezigheid van Innovax-ND onderzocht in verschillende organen en weefsels van geïnfecteerde dieren. Innovax-ND was aanwezig in de verwachte weefsels (milt, thymus, bursa, bloed en veerfollikels) en werd niet aangetoond in orale spoelingen en cloacale monsters. Deze resultaten waren hetzelfde voor de het uitgangsvirus MeHV-1. Hieruit concludeert de aanvrager dat het weefseltropisme van dit vaccin niet anders is dat die van het uitgangsvirus.

In de tweede studie met Vectormune-ND werd de aanwezigheid van het virus en het uitgangsvirus MeHV-1 FC-126 op verschillende tijdstippen na infectie bepaald. Beide virussen werden aangetroffen in monsters van de milt, de long, de lever, de nier, de bursa, de veerpennen, witte bloedcellen en cloacale swabs. De virussen werden niet aangetoond in trachea swabs. Op basis van deze studie concludeert de aanvrager dat de insertie van het NDV F gen in MeHV-1 niet leidt tot een verandering in het weefseltropisme.

In de derde studie werd de verspreiding van het weefseltropisme van Vaxxitek HVT+IBD vergeleken met MeHV-1. De aanwezigheid van virus werd onderzocht in de bursa, veermonsters, trachea- en cloacale swabs. Beide virussen werden alleen teruggevonden in de monsters van de veren. Dat de virussen niet in de bursa gevonden werden, komt volgens de aanvrager doordat de gebruikte technieken niet gevoelig genoeg waren.

De aanvrager is van mening dat de bovenstaande studies aantonen dat het tropisme van MeHV-1 recombinante virussen waarin een F gen of een VP2 gen zijn geïnsereerd niet veranderd is.

De COGEM heeft de aanvrager gevraagd om informatie over het tropisme van aan HVT-ND-IBD verwante vaccinstammen te overleggen, zodat een inschatting gemaakt kan worden van het tropisme van HVT-ND-IBD. De bovenstaande studies bevatten informatie over het tropisme van MeHV-1 virussen waarin of het F gen uit NDV of het VP2 gen uit IBDV aanwezig zijn. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat het tropisme van HVT-ND-IBD zeer waarschijnlijk niet verschilt van dat van het uitgangsvirus MeHV-1. Omdat in deze studies de mogelijke overdracht van HVT-ND-IBD naar kalkoenen niet onderzocht wordt, is de COGEM van mening dat de eerder voorgestelde managementmaatregel, dat er binnen een straal van 5 kilometer geen kalkoenenboerderijen aanwezig zijn, noodzakelijk is.

## **Conclusie**

De COGEM is van mening dat de aangeleverde informatie de eerdere bedenkingen wegneemt. De COGEM verwacht dat de risico's voor mens en milieu bij deze veldstudie met HVT-ND-IBD verwaarloosbaar klein zijn, onder de eerder voorgenomen managementmaatregelen.

## **Referenties**

1. COGEM (2016). Veterinaire studie met een kippenvaccin tegen de ziekte van Marek, Newcastle Disease en Infectious Bursal Disease. COGEM advies CGM/160120-01
2. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor toepassing in klinische of veterinaire studies. COGEM advies CGM/130227-05