

Advies betreffende: ***Streptococcus equi* deletiemutant voor toepassing als vaccin in paardachtigen (equidae)**

Kennisgever: **Intervet International BV**

COGEM kenmerk  
**CGM/030130-01**

BGGO nummer  
**EMEA 02/03**

Datum advies  
**3 februari 2003**

## Inleiding

Het betreft een aanvraag voor de centrale registratie van het veterinaire vaccin Equilis StrepE tegen de wildtype *Streptococcus equi* dat droes veroorzaakt bij paarden. Droes is een infectieziekte welke abcesvorming van de submandibulaire- en hals-lymfklieren veroorzaakt. Het paard kan deze klasse 2 pathogene bacterie binnen krijgen door direct contact met besmette paarden. *S. equi* komt van nature voor in de amandelen en de darmen. De ziekteverwekkendheid berust op het feit dat de bacteriën de lymfeklieren infecteren en zich hierin vermenigvuldigen waardoor er een abces ontstaat. Dit abces kan een negatief effect hebben op de ademhaling en het slikken.

Het wildtype *S. equi* kan in het milieu, onder optimale omstandigheden 7-9 weken overleven (3). De bacterie kan zich bij een temperatuur beneden de 20°C niet vermenigvuldigen (3). In principe kan *S. equi* alleen paardachtigen infecteren, maar in de literatuur zijn tenminste twee gevallen beschreven waarbij een *S. equi* infectie in mensen is aangetoond (1; 2).

## ***Streptococcus equi* vaccin**

Het vaccin is een levende, marker-vrije deletiemutant van een niet pathogene *S. equi*. Deze geattenueerde stam van *S. equi* bezit geen pathogene eigenschappen, maar is wel in staat om een immunologische bescherming te bieden tegen infectie met het pathogene wildtype. De genetisch gemodificeerde *S. equi* heeft een deletie in het *aroA* gen. Het *aroA* genproduct speelt een essentiële rol bij de biosynthese van aromatische aminozuren door *S. equi*. Ten gevolge van de deletie van het *aroA* gen wordt de bacterie voor de groei afhankelijk van aromatische verbindingen welke in zoogdiercellen onvoldoende aanwezig zijn. Uit onderzoek met muizen is gebleken dat de betreffende vaccin stam een factor  $10^4$  minder virulent is dan het wildtype *S. equi*. Het verschil tussen een infectie met het genetisch gemodificeerde *S. equi* of met een wildtype *S. equi*, kan met behulp van een Southern Blot analyse of een PCR worden waargenomen. De deletiemutant kan bij paarden slechts gedurende korte tijd uit de entplaats teruggekweekt worden uit het exudaat. Echter, terugkweken van *S. equi* uit mond- en neusspoelsels blijkt niet mogelijk te zijn. In een enkel geval kan de deletiemutant later uit gevaccineerde paarden teruggekweekt worden. Dit is waarschijnlijk alleen mogelijk indien er co-infectie met *Streptococcus zoëpidemicus* optreedt.

## Risicoanalyse

Genoverdracht bij streptococconen kan plaatsvinden middels conjugatie, natuurlijke transformatie en transductie door bacteriofagen. In het geval van *S. equi* is er geen sprake van een 'efficiënte' DNA opname. Het kan echter niet uitgesloten worden dat willekeurig DNA opgenomen wordt dat niet gerelateerd is aan de *aroA* deletie. Daarnaast is het ook mogelijk dat *aroA* sequenties worden opgenomen. Herstel van de *aroA* mutatie kan theoretisch plaatsvinden door het uitwisselen van genetische informatie met andere *S. equi* stammen of door uitwisseling met het verwante *S. zoëpidemicus*. Echter een natuurlijke transformatie van de vaccinstam met genomisch DNA van verwante soorten is niet aangetoond.

Het *S. equi* vaccin is niet in staat paarden via een natuurlijke verspreidingsroute te infecteren. Het is niet mogelijk gebleken om genetisch gemodificeerde *S. equi* uit het milieu te isoleren, bijvoorbeeld na zogenaamde veegtesten van drink- en voederbakken of van de afrastering waar gevaccineerde paarden mee in aanraking zijn geweest. De aanvrager heeft aangegeven dat onmiddellijk na vaccinatie een beperkte hoeveelheid van het GGO in het milieu kan verspreiden door het lekken van het vaccin uit de injectieplaats. De levensvatbaarheid van het GGO is 99% op de eerste dag en loopt af tot 0% na 4 tot 5 weken. Daar het hier een deletiemutant betreft wordt er geen nieuw DNA in het milieu geïntroduceerd. De fitness van het *S. equi* vaccin is vele male lager dan het wildtype en kan zich niet in het milieu handhaven, behalve gedurende de korte tijd op een plaats waar het geïnjecteerd wordt. Het vaccin zal eenmalige submucosaal toegediend worden aan de binnenkant van de bovenlip. Effecten op non-target organismen zijn niet eerder waargenomen, aangezien het gastheerbereik van het wildtype en GGO *S. equi* zich beperkt tot Equidae.

## Conclusies en Advies

De COGEM heeft op 13 november 1998 geadviseerd over de vergunningaanvraag BGGO 98/20 (CGM/981113-01), betreffende de introductie in het milieu van een *S. equi* deletiemutant voor toepassing als vaccin in paardachtigen. De betreffende deletiemutant is tevens door de COGEM beoordeeld (CGM/940711-13) in het kader van ingeperkt gebruikaanvraag BGGO 94-133. Destijds zijn handelingen met *S. equi* deletiemutanten omlaaggeschaald van C-I naar VMT (CGM/950523-17). In het advies voor de introductie in het milieu aanvraag (CGM/981113-01) komt de COGEM tot de algemene conclusie dat er uit oogpunt van de veiligheid van mens en milieu geen bezwaar bestaat voor de uitvoering van de experimenten. In het betreffende advies wordt echter aangegeven dat aan de volgende punten voldaan moet worden alvorens overgegaan kan worden tot registratie van het vaccin, hetgeen in de huidige aanvraag aan de orde is.

In de voorgaande introductie in het milieu aanvraag (BGGO 98/20) was de 1% detectielimiet van de oro-nasale flora onvoldoende onderbouwd. Met name de gebruikte detectie- en kweekmethoden was onvoldoende en de aanvrager had hierover nadere gegevens moeten leveren. De COGEM is van mening dat in de huidige aanvraag de detectielimiet van 0.028% cfu per totaal aantal cfu van de normale neusflora voldoende hoog is, mede gezien de aard van het micro-organisme. Echter, de COGEM acht het

wenselijk om gegevens toe te voegen over betrouwbaarheidsintervallen, wijze van vaststellen en referentiekader, aangezien de detectielimiet weinig informatief is zonder deze data.

In het advies CGM/981113-01 heeft de COGEM verzocht gegevens te verstekken over de vaccinatiestudies waarbij een hoge dosering van het vaccin ( $10^{11}$  cfu/paard) werd toegediend. In het huidige dossier heeft de aanvrager een meer dan tienvoudige dosis in een aantal paarden getest welke in de buurt komt van  $10^{11}$ . Tienvoud is een gebruikelijke en geaccepteerde marge bij veterinaire vaccins. Op de injectieplaats kan tot dag 7 het micro-organisme nog aangetoond worden. De COGEM is van mening dat gevaccineerde dieren gedurende deze tijd geïsoleerd dienen te worden en niet in de voedselketen terecht mogen komen om de reeds geringe risico's verder te reduceren.

De informatie die de aanvrager vertrekt over het zoönotisch potentieel van het vaccin is summier, maar toereikend. Wild type *S. equi* voldoet aan de criteria voor klasse 1 van de WHO. *S. equi* is zeer verspreid onder paarden, en de meeste paardenverzorgers en alle dierartsen kwamen en komen ermee in contact, vaak intensief. Het organisme is in principe niet in staat ziekte te veroorzaken bij gezonde volwassenen met uitzondering van de twee beschreven infecties met *S. equi* in mensen (1; 2). Het zoönotisch potentieel van de deletiemutant zal echter vele malen lager zijn dan van het wildtype *S. equi*. De COGEM acht de beschikbare informatie dan ook voldoende om zoönose uit te kunnen sluiten.

Ten aanzien van de productie van het vaccin heeft de COGEM voorheen geadviseerd (CGM/010912-01) dat met een 24 uur durende behandeling met 0.5% formaline het op het filter aanwezige vaccin volledig wordt geïnactiveerd. Destijds werd de inactivatietest op kleine schaal uitgevoerd en heeft de COGEM geadviseerd de inactivatietest te herhalen bij de eerste twee grootschalige productiecycli. Het doel hiervan is om vast te stellen of inactivatie van het vaccin in het filtraat ook optreedt wanneer grootschalige productie plaatsvindt. De gegevens over de inactivering die in de huidige aanvraag geleverd worden acht de COGEM voldoende. De marge en blootstelling aan de formaline is gedurende 24 uur, terwijl na 16 uur geen micro-organismen meer aantoonbaar zijn.

De COGEM is van mening dat het vaccin een hoge mate van veiligheid kent, gebaseerd op een natuurlijke biologische inperking van diersoortspecificiteit, die versterkt wordt door de deletie van een essentieel gen voor het metabolisme van de bacterie. Eventuele nadelige effecten van het vaccin zullen altijd geringer zijn dan die van de natuurlijke wildtype *S. equi*. De door de COGEM naar voren gebrachte overwegingen zijn geen bezwaren die zouden leiden tot afwijzing van de aanvraag. Concluderend acht de COGEM de risico's van het vaccin voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

1. Breiman, R. F. and Silverblatt, F. J. (86). West J Med 145, blz. 385-6
2. Duma, R. J., Weinberg, A. N., Medrek, T. F., and Kunz, L. J. (69). Medicine 48, blz. 87-127
3. Rush, B. (98). The Compendium, July, blz. 844-845