

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 16 april 2009
KENMERK CGM/090416-01
ONDERWERP Advies: omlaagschaling werkzaamheden *Rhodococcus equi* vaccinstam

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de aanvraag tot wijziging van vergunning IG 99-123 met de titel 'Ontwikkeling van een vaccin tegen *Rhodococcus equi* infecties bij dieren' van Intervet International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over omlaagschaling van werkzaamheden met de bacteriestam *Rhodococcus equi* RG2837. De aanvrager is voornemens *R. equi* RG2837 als vaccin te testen in veulens, die gezoogd worden door niet-gevaccineerde merries. De RG2837 stam mist vier genen die betrokken zijn bij het metabolisme van steroïden, waardoor de stam verzwakt is.

De door de aanvrager overlegde resultaten vormen volgens de COGEM voldoende bewijs voor attenuatie van de RG2837 stam. De COGEM adviseert om de merries te testen op afwezigheid van *R. equi*, zodat reversie naar wildtype virulentie kan worden voorkomen. Het aantal infecties van gezonde personen door wildtype *R. equi* is zeer beperkt. Behandeling met antibiotica heeft in de meeste van deze gevallen tot genezing geleid. Alles in overweging nemende, is de COGEM van mening dat de werkzaamheden met RG2837 plaats kunnen vinden op ML-I en DM-I inperkingsniveau. Op deze inperkingsniveaus acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De merries zullen worden getest op het uitscheiden van *R. equi* en *R. equi* RG2837 met behulp van twee tests. De COGEM adviseert om altijd beide tests uit te voeren, teneinde de kans op detectie van *R. equi* te maximaliseren. Daarnaast adviseert de COGEM om ook de veulens op uitscheiden te testen. Als de merries na afloop van de proef meerdere dagen aangetoond ggo-vrij zijn, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij huisvesting van de merries zonder inperking verwaarloosbaar klein.

Dit advies bevat vertrouwelijke informatie en zal derhalve niet gepubliceerd of op een andere wijze openbaar gemaakt worden. 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 large, stylized initial 'Z' followed by a long horizontal stroke that ends in a small hook.

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

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

Omlaagschaling van werkzaamheden met een *Rhodococcus equi* vaccinstam

COGEM advies CGM/090416-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde vaccinstam RG2837 van de bacterie *Rhodococcus equi*. De aanvrager, Intervet International BV, verzoekt deze werkzaamheden toe te voegen aan de bestaande vergunning IG 99-123 met de titel 'Ontwikkeling van een vaccin tegen *Rhodococcus equi* infecties bij dieren'. De aanvrager wil de *R. equi* RG2837 stam testen in paardenveulens in het kader van de ontwikkeling van een vaccin tegen *R. equi*.

Rhodococcus equi bacterie

De bacterie *Rhodococcus equi* (familie *Nocardiaceae*) is een pathogene, niet-sporenvormende coccobacillus die wereldwijd in de bodem voorkomt.¹ De natuurlijke gastheer van *R. equi* is het veulen. Mensen, huisdieren en vee, zoals varkens en geiten, kunnen ook geïnfecteerd worden, hoewel dit vrij zeldzaam is. Het inhaleren van stofdeeltjes besmet met *R. equi* vormt de voornaamste bron van besmetting, naast opname van grond en mest bij grazen.² Oudere paarden zijn meestal resistent tegen *R. equi*, die zich in hun maag-darmkanaal en mest kan bevinden. In veulens van één tot zes maanden oud kan *R. equi* een ernstige ziekte veroorzaken die gekenmerkt wordt door chronische longontsteking, meestal in combinatie met een zwerende dikkedarmonsteking.³ In gemiddeld 60% van de gevallen leidt de ziekte tot de dood van de veulens.⁴

Na infectie persisteert en repliceert de bacterie in de macrofagen van de gastheer, die uiteindelijk gedood kunnen worden.⁵ Voor volvirulentie van de bacterie is de aanwezigheid van een virulentieplasmide nodig. Dit plasmide is 70-100 kB groot en codeert onder andere voor 'virulence associated proteins', Vaps. Volvirulente stammen bezitten het VapA antigeen, terwijl middelmatig virulente stammen het gerelateerde VapB antigeen bezitten.⁵ Avirulente stammen hebben geen virulentieplasmide.⁵ De specifieke rollen van de Vaps in het virulentiemechanisme van *R. equi* zijn nog niet bekend.⁵

De standaardbehandeling van zieke veulens bestaat uit de toediening van de antibiotica erythromycine en rifampicine. Een vaccin tegen *R. equi* is nog niet beschikbaar. Preventieve toediening van hyperimmuun plasma afkomstig van gevaccineerde paarden aan net geboren veulens kan leiden tot vermindering van ziekte en sterfte.³

Humane infectie

Het aantal humane infecties met *R. equi* is zeer beperkt. De meerderheid van de patiënten geïnfecteerd met *R. equi* is immunodeficiënt.¹ Overdracht van mens op mens is eenmalig waargenomen bij HIV-geïnfecteerde personen.¹ *R. equi* kan immunocompetente personen infecteren, maar tot 2001 waren hiervan slechts negentien gevallen bekend.⁶ De helft van deze

gevallen betroffen lokale infecties.⁶ Twee van de negentien patiënten overleden, de anderen genazen van *R. equi* infectie door behandeling met antibiotica.⁶ De overleden patiënten hadden pulmonaire infectie met *R. equi*. De ene overleden patiënt leed daarnaast aan chronische amoebedysenterie met leverabcessen en een bronchobiliaire fistel. De andere overleden patiënt was 83 jaar, werd behandeld met verkeerde antibiotica en overleed voordat *R. equi* als oorzaak was geïdentificeerd.

Enzymatische karakteristieken van het Rhodococcus genus

De bacteriën in het genus *Rhodococcus* worden gebruikt voor biotechnologische en milieutoepassingen vanwege hun unieke enzymatische eigenschappen en katabolische diversiteit.⁷ Ze zijn in staat om schadelijke stoffen zoals PCBs, toluen en herbiciden te metaboliseren en zwavelgroepen in fossiele brandstof te verwijderen.⁸ Daarnaast kunnen ze steroïden zoals phytosterolen en cholesterol verwerken tot bioactieve stoffen zoals steroïdhormonen (o.a. testosteron).⁹ *R. equi* is in staat om plantaardige en dierlijke steroïden als enige koolstof- en energiebron te gebruiken.¹⁰

Eerder COGEM advies

R. equi is in de Regeling ggo ingeschaald als een klasse 2 pathogeen. In 2006 heeft de COGEM over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *R. equi* geadviseerd.² De aanvrager verzocht om omlaagschaling van *R. equi* van pathogeniteitsklasse 2 naar klasse 1, zodat handelingen met genetisch gemodificeerde *R. equi* uitgevoerd konden worden op ML-I niveau. De COGEM stelde dat *R. equi* niet aan de voorwaarden voor een klasse 1 pathogeen voldoet. Verder stelde de COGEM dat er een te beperkte kennis is over de epidemiologie, pathogenese en transmissieroutes van dier naar mens en van mens naar mens om de soort *R. equi* als niet-pathogeen te beschouwen.

Adviesvraag

De aanvrager beschikt over een vergunning voor laboratoriumhandelingen en dierproeven met recombinante *R. equi* stammen. Het is niet bekend hoe virulent de betreffende recombinante *R. equi* stammen zijn.

De laboratoriumwerkzaamheden met recombinante *R. equi* vinden plaats op ML-II niveau. De aanvrager vraagt voor de stam *R. equi* RG2837 een verlaging van deze inschaling naar ML-I aan.

In de huidige vergunning vinden dierproeven met recombinante *R. equi* stammen in een aantal knaagdieren, zoals muizen, konijnen en hamsters, op DM-II niveau plaats. Werkzaamheden in paarden met recombinante *R. equi* zijn op DM-III niveau vergund. Voor werkzaamheden met *R. equi* vaccinstam RG2837 in paarden vraagt de aanvrager een omlaagschaling van DM-III naar DM-I niveau aan.

De gevaccineerde veulens zullen melk drinken bij merries die niet behandeld worden met de RG2837 stam. De aanvrager meldt dat op DM-III niveau, onder de huidige vergunning, de merries niet voor langere tijd gehuisvest kunnen blijven en daarom worden gedood. Na afloop van de voorgenomen experimenten op DM-I wil de aanvrager de merries, bij aantoonbare afwezigheid van *R. equi* RG2837, buiten inperking huisvesten.

Voorgenomen werkzaamheden

Vaccinstam R. equi RG2837

Vaccinstam *R. equi* RG2837 is afgeleid van de wildtype pathogene stam *R. equi* RE-1. Deze wildtype stam is in Nederland in 2007 geïsoleerd uit een veulen met pyrogranulomateuze longontsteking.¹⁰ Uit RE-1 zijn vier genen verwijderd om RG2837 te verkrijgen. Deze genen spelen een rol in de afbraak van organische verbindingen, waaronder natuurlijke steroïden zoals cholesterol en fytosterolen. De genen coderen voor twee enzymen, IpdA en IpdB. De genen liggen in het *ipdAB* operon, waarvan er twee kopieën op het chromosoom zijn. Hierdoor zijn er vier *ipdA* en *ipdB* genen: *ipdA₁*, *ipdA₂*, *ipdB₁* en *ipdB₂*.

De twee operons zijn met behulp van de homologe-recombinatietechniek bijna geheel verwijderd uit het genoom van *R. equi* RE-1. Deze techniek laat geen vectorsequenties achter in het organisme.¹⁰ Een vector met daarin operon-flankerende sequenties wordt in de bacterie gebracht en het gehele plasmide recombineert in het operon van de bacterie. Door selectie vindt er een tweede recombinatie plaats, waarbij het plasmide uit het locus recombineert. Deze recombinatie leidt ertoe dat het wildtype operon vrijwel geheel wordt verwijderd. In het genoom van RG2837 is slechts een klein gedeelte van het *ipdAB* operon aanwezig.

Dierproeven met R. equi RG2837

De RG2837 stam zal als vaccin getest worden in jonge veulens. Daartoe zal de stam meerdere malen oraal toegediend worden bij veulens die 3 dagen tot 3 weken oud zijn. De dosering is 1 ml met 1×10^7 tot 5×10^{10} kolonievormende eenheden (colony forming units, CFU) van *R. equi* RG2837. Er zullen bloedmonsters worden genomen, evenals neus- en rectale uitstrijkjes, om uitscheiding (shedding) van het ggo te testen. Zes tot acht weken na toediening van de stam zullen de veulens worden gedood en weefselmonsters worden genomen.

De veulens worden gezoogd door merries. Deze merries worden niet behandeld met het ggo. Er zullen rectale uitstrijkjes gemaakt worden van de merries om aan te tonen of zij geïnfecteerd zijn met het ggo en het ggo uitscheiden. De aanvrager heeft hier twee tests voor beschikbaar, een selectieve agar om *R. equi* te detecteren, en een specifieke PCR gebaseerd op een van de deleties in de RG2837 stam. Beide tests hebben een detectielimiet van minimaal 10 CFU per 100 mg feces. Een normale darmflora bestaat uit ongeveer 10^6 CFU bacteriën per 100 mg feces. Deze tests tonen respectievelijk *R. equi* of *R. equi* RG2837 aan als die minstens 0,001% van de totale darmflora uitmaakt.

Overweging en advies

Aard van de deleties in R. equi RG2837

De *ipdAB* genen, die zijn verwijderd uit RG2837, zijn betrokken bij de afbraak van steroïden zoals cholesterol. Er is nog zeer weinig onderzoek gedaan naar steroïdenmetabolisme in *R. equi*.¹⁰ Recent is uit onderzoek gebleken dat *Mycobacterium tuberculosis*, een bacterie die nauw verwant is aan *Rhodococcus*, een sterk verminderde persistentie heeft in macrofagen na inactivatie van genen die betrokken zijn bij de import van cholesterol van de gastheer.¹¹ *Rhodococcus jostii*

RHA1 bezit zo'n 50 genen die tot expressie komen als de bacterie op cholesterol groeit en die geconserveerd zijn tussen *Rhodococcus jostii* RHA1 en *M. tuberculosis*.¹² Een aantal van deze genen komen tot verhoogde expressie tijdens overleving van *M. tuberculosis* in macrofagen.¹² De voorgaande resultaten lijken te wijzen op een belangrijke functie voor cholesterolopname en metabolisme in de overleving van zowel *Rhodococcus* als *Mycobacterium* soorten in macrofagen.¹² Echter, het uitschakelen van de *supAB* genen, die essentieel zijn voor de groei van *R. jostii* RHA1 op cholesterol en waarschijnlijk betrokken zijn bij het cholesterol importsysteem in *R. equi*, had geen attenuerend effect op de overleving van de *supAB* deletiestam in macrofagen.¹⁰

De tot nu toe gepubliceerde resultaten over de functie van steroïdenmetabolisme in de overleving van *R. equi* in macrofagen zijn niet eenduidig. De precieze functie van genen die betrokken zijn bij steroïdenmetabolisme, zoals de *ipdAB* genen, in de virulentie van *Rhodococcus* is nog onduidelijk.

De twee operons van de *ipdAB* genen zijn gelocaliseerd op het bacteriële chromosoom. Vanwege de locatie van de deleties op het chromosoom, zal complementatie van de deleties via conjugatie van plasmiden niet kunnen optreden.

Reversie van een deletie in RG2837 kan theoretisch optreden in aanwezigheid van wildtype DNA. De kans hierop is zeer klein, aangezien het een chromosomale deletie betreft en nagenoeg het gehele operon verwijderd is. Een eventuele reversie zal in het uiterste geval kunnen leiden tot een wildtype *R. equi* bacterie.

De wildtype *R. equi* bacterie kan aanwezig zijn in de merrie. De COGEM adviseert daarom om de merries te testen op afwezigheid van wildtype *R. equi*. Onder deze voorwaarde acht de COGEM de kans dat een eventuele reversie van een deletie in RG2837 optreedt verwaarloosbaar klein.

Pathogeniteit van R. equi RG2837

De vaccinstam *R. equi* RG2837 is *in vitro* getest in een macrofagen overlevingsexperiment¹⁰, waarin gebruik werd gemaakt van een humane monocytene cellijn. De RG2837 stam is vergeleken met de wildtype ouderstam RE-1. De overleving van de stammen in macrofagen werd gemeten in CFU/ml tot 76 uur na infectie. RE-1 liet een aanhoudend hoge overleving zien, terwijl de overleving van RG2837 in macrofagen snel verminderde, tot er 76 uur na infectie geen bacteriën meer in de macrofagen aanwezig waren. Dit wijst erop dat de overleving van RG2837 in macrofagen duidelijk gereduceerd is.

Daarnaast werd RG2837 *in vivo* getest door 6×10^6 CFU bacterie intratracheaal (in de luchtpijp) in zes veulens toe te dienen en de klinische effecten te evalueren. De controle van dit experiment bestond uit de intratracheale toediening van 4×10^6 CFU wildtype virulente ouderstam RE-1 bij twee veulens. De veulens waren 3 tot 7 weken oud. De ouderstam RE-1 veroorzaakte pyrogranulomateuze longontsteking bij de veulens. De RG2837 stam veroorzaakte daarentegen geen longontsteking. Dit laat zien dat het ziekteverwekkende vermogen van RG2837, ten opzichte van ouderstam RE-1, significant lager is.

De COGEM merkt op dat het aantal dieren dat gebruikt is voor het *in vivo* experiment beperkt is. Dit vindt zijn oorzaak in de aard van het proefdier, namelijk een veulen dat nog gezoogd wordt door de merrie. Informatie over shedding van RG2837 tijdens en na het *in vivo* experiment had meer inzicht kunnen geven in de pathogenese van RG2837.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van mening dat de *in vitro* en *in vivo* proeven met RG2837 voldoende bewijs leveren voor attenuatie van RG2837.

Humane infectie door R. equi RG2837

Het aantal infecties met wildtype *R. equi* in gezonde personen is zeer beperkt. Behandeling van de infectie met antibiotica heeft in bijna 90% van de gevallen tot genezing geleid. De overleving van deletiestam RG2837 in humane macrofagen is duidelijk gereduceerd. De verminderde pathogeniteit in paarden geeft een extra indicatie dat RG2837 ook voor mensen verminderd pathogeen is.

Testen van merries op aanwezigheid van RG2837

De vaccinstam RG2837 zal oraal worden toegediend aan veulens, waardoor de stam in de darm en de feces van de veulens zal terechtkomen. Het opeten van mest is gedrag wat voorkomt bij paarden.¹³ De merries kunnen RG2837 opeten of inademen via de besmette feces van het veulen. De aanvrager zal de merries met behulp van twee tests op uitscheiding van RG2837 in rectale uitstrijkjes controleren. Indien de merries niet geïnfecteerd zijn met *R. equi* en geen ggo uitscheiden, wil de aanvrager ze na afloop van het experiment zonder inperking huisvesten.

De aanvrager kan met behulp van twee tests, een selectieve agar en een PCR, shedding van *R. equi* aantonen. De agar-test toont alle *R. equi* bacteriën aan, terwijl de PCR-test specifiek de RG2837 stam aantoonst. Dit type tests wordt standaard gebruikt voor het aantonen van bepaalde organismen of ggo's. De COGEM acht de voorgestelde tests geschikt om het ggo aan te tonen en te kwantificeren. Bovendien adviseert de COGEM om altijd beide tests uit te voeren voor de detectie van shedding, omdat de tests elkaar aanvullen in hun functionaliteit. Gezien de detectielimiet van beide tests (10 CFU/100 mg feces) acht de COGEM de kans dat shedding onontdekt blijft zeer klein.

De COGEM adviseert om, na afloop van het experiment, elke dag rectale uitstrijkjes te maken bij de merries. Als de merries zeven achtereenvolgende dagen negatief voor *R. equi* en *R. equi* RG2837 blijken in de twee voorgestelde tests, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij huisvesting van de merries zonder inperking, verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseert om tijdens de proef een grondige shedding-analyse uit te voeren op de gevaccineerde veulens. De RG2837 stam is geattenuëerd en zal nauwelijks kunnen repliceren in de darm. Dit zal leiden tot een verminderde aanwezigheid van RG2837 in de mest van de veulens en een verminderde blootstelling van de merries aan RG2837, ten opzichte van wildtype *R. equi*. Als de veulens niet of nauwelijks *R. equi* RG2837 uitscheiden, is infectie van de merries niet of

nauwelijks mogelijk. Hierdoor zullen de risico's voor mens en milieu van werkzaamheden met RG2837, evenals van huisvesting van de merries buiten inperking na het experiment, zeer klein zijn. Dergelijke gegevens zullen daarnaast noodzakelijk zijn voor eventuele toekomstige experimenten en toepassingen.

Conclusie

Vanwege de attenuatie van RG2837, het zeer beperkte aantal infecties van wildtype *R. equi* bij gezonde mensen, en de mogelijkheden tot behandeling bij eventuele infectie, is de COGEM van mening dat laboratoriumwerkzaamheden en dierproeven met *R. equi* RG2837 plaats kunnen vinden op respectievelijk ML-I en DM-I inperkingsniveau. Op deze inperkingsniveaus acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseert hierbij de volgende aanvullende voorschriften:

- de merries worden voorafgaand aan de proef getest op afwezigheid van wildtype *R. equi*;
- de veulens worden tijdens de proef op shedding getest;
- de merries worden na de proef elke dag op shedding getest;
- de agar-test en de PCR-test worden beide uitgevoerd om shedding bij merries te detecteren.

Referenties

1. Weinstock DM & Brown AE (2002). *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin. Infect. Dis. 34:1379-1385
2. COGEM (2006). Omlaagschaling van werkzaamheden met *Rhodococcus equi*. Advies CGM/060314-05
3. Giguère S (2000). *Rhodococcus equi* infections. In: Recent advances in equine neonatal care. Wilkins PA en Palmer JE (eds). Published online by International Veterinary Information Service
4. Dungworth DL (1993). *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* infection. In: Jubb KVF, Kennedy PC, en Palmer N (eds), Pathology of Domestic Animals, 4th edn, 652-655. Academic Press, San Diego, CA
5. Meijer WG & Prescott JF (2004). *Rhodococcus equi*. Vet. Res. 35: 383-396
6. Kedlaya I *et al.* (2001). *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. Clin. Infect. Dis. 32:e39-47
7. Geize van der R & Dijkhuizen L (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Curr. Opin. Microbiol. 7:255-261
8. Martínková L *et al.* (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environ. Int. 35:162-177
9. Fernandes P *et al.* (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme Microbial Tech. 32:688-705
10. Geize van der R *et al.* (2008). A novel method to generate unmarked gene deletions in the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using 5-fluorocytosine conditional lethality. Nucleic Acids Res. 36:e151
11. Pandey AK & Sasseti CM (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:4376-4380

12. Geize van der R *et al.* (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:1947-1952
13. Pavo paardenvoeding - Zand en mest eten: www.pavo.nl/voeding/zand-en-mest-eten.html (08-04-2009)