

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

DATUM 09 november 2016
KENMERK CGM/161109-02
ONDERWERP Advies 'classificatie en inschaling werkzaamheden met aviair *Escherichia coli*'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de dossiers IG 16-251_IIv en IG 16-252_IIIk getiteld "Onderzoek in pluimvee naar de veiligheid en werkzaamheid van een levend bacterieel vaccin geattenuerd door gendeletie" ingediend door Boehringer Ingelheim Animal Health Operations B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van aviair pathogene *Escherichia coli* (APEC) en daarbij aan te geven of deze bacterie strikt dierpathogeen is. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) mutanten van APEC. De gg-APEC mutanten bevatten verschillende combinaties van deleties in genen coderend voor eiwitten betrokken bij de ijzeropname, waardoor ze geattenuerd zijn.

Gebaseerd op de aard van de ziekte die APEC veroorzaakt, en gezien het feit dat de bacterie niet pathogeen is voor de mens en enzoïetisch is, adviseert de COGEM APEC als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.


Gezien deze inschaling en het feit dat de gg-APEC deletiemutanten geattenuerd zijn en niet invasief, acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd, indien de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden met gg-APEC op ML-II inperkingsniveau worden uitgevoerd en de *in vivo* infectieproeven met kippen op DM-II inperkingsniveau.

Onder genoemde voorwaarden en onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



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

Advies classificatie en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde aviair pathogene *Escherichia coli*

COGEM advies CGM/161109-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld 'Onderzoek in pluimvee naar de veiligheid en werkzaamheid van een levend bacterieel vaccin geattenuerd door gendeletie' (IG 16-251 en IG 16-252) ingediend door Boehringer Ingelheim Animal Health Operations B.V.

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de pathogeniteitsklasse van aviair pathogene *Escherichia coli* (APEC). Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) APEC.

De vergunningaanvraag omvat de productie van gg-APEC en infectie-experimenten met kippen en de analyse van cellen en weefsels. Doel van de voorgenomen werkzaamheden is het testen van de veiligheid en werkzaamheid van gg-APEC mutanten als veterinair vaccin.

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) is een gramnegatieve staafvormige bacterie behorende tot de familie *Enterobacteriaceae*. Het is een commensale bacterie die onderdeel uitmaakt van de darmflora van dieren en mensen.¹ Onder *E. coli* stammen bevinden zich ook ziekteverwekkende varianten, die intestinale of extra-intestinale infecties veroorzaken. Intestinale infecties worden veroorzaakt door *E. coli* varianten als enterotoxigene, enteropathogene en enterohemorragische *E. coli* (respectievelijk ETEC, EPEC en EHEC) en leiden voornamelijk tot diarree. Een infectie met EHEC kan daarnaast hemorragische colitis veroorzaken, waarbij als complicatie het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) kan optreden wat kan leiden tot de dood. Extra-intestinale infecties waaronder urineweginfectie en meningitis wordt veroorzaakt door extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC).²

2.1 Aviair pathogene *E. coli* (APEC)

Nauw verwant aan de humane ExPEC is de zogenaamde aviair pathogene *E. coli* (APEC). APEC veroorzaakt de vogelziekte colibacillose in onder andere kippen, kalkoenen, eenden en fazanten. Infectie vindt plaats via de luchtwegen, de geslachtsorganen of door fecale contaminatie van de eierschaal. Contaminatie van de eierschaal kan leiden tot penetratie van de bacterie door de eierschaal en infectie veroorzaken aan de dooierzak. Daarnaast kan de bacterie zich verspreiden via besmet drinkwater of voedsel en enige tijd buiten het vogellichaam overleven in droge stoffige condities.^{1,3,4}

De ernst van de ziekte hangt af van een aantal factoren zoals het serotype van de stam, de virulentiefactoren van de bacterie, de gastheer en predisponerende factoren.⁶ Verschillende serotypen zijn geassocieerd met colibacillose.⁴ Colibacillose veroorzaakt zowel lokale als systemische infecties.

Lokale infecties die optreden bij colibacillose zijn onder andere infecties van de geslachtsorganen van geslachtsrijpe vogels (dooierzak peritonitis) en infecties van de dooierzak van net uitgebroede kuikens (omphalitis).⁴

De systemische vorm van colibacillose begint als een luchtweginfectie na inademing van besmette stofdeeltjes en wordt gevolgd door kolonisatie van de lever en de hartzak (pericardium) en leidt tot bloedvergiftiging (colisepticemia). Vogels die de bloedvergiftiging overleven, ontwikkelen laesies als gevolg van ontstekingen aan de luchtwegen (airsacculitis), het hart (pericarditis) en de lever (perihepatitis). De systemische vorm van colibacillose is meestal een secundaire infectie die optreedt bij dieren die al besmet zijn met een ander organisme zoals infectieuze bronchitisvirus (IBV) of *Mycoplasma*. Daarnaast zijn gestreste, immuungecompromitteerde en jonge vogels bevattelijk voor systemische APEC infecties.^{1,4}

Colibacillose veroorzaakt grote economische schade in de pluimvee-industrie. Om APEC uitbraken tegen te gaan worden preventieve maatregelen genomen zoals een goede stalhygiëne. Ook wordt stof- en ammoniakopstapeling in de stal voorkomen en wordt er gezorgd voor een goed uitgebalanceerd stalklimaat. APEC infecties worden voornamelijk bestreden met antibiotica. Dit is echter niet altijd effectief omdat APEC-stammen resistentie tegen veel van de gebruikte antimicrobiële middelen vertonen. Daarnaast kunnen dieren worden gevaccineerd. De grote diversiteit van APEC-stammen maakt het ontwikkelen van een universeel werkend vaccin lastig.^{1,4,5,6} In Europa worden voornamelijk de serotypen O1, O2, O5, O8 en O78 geïsoleerd uit zieke vogels.⁴

2.2 Virulentiefactoren APEC

APEC stammen bevatten plasmides met genen die coderen voor factoren die geassocieerd zijn met virulentie, zoals genen betrokken bij ijzeropname, bacteriële adhesie, invasie, anti-fagocytische activiteit en serumresistentie. Geen van deze factoren is universeel aanwezig in APEC en waarschijnlijk worden verschillende virulentiemechanismen gebruikt door de APEC stammen.^{4,5,6}

Net als andere organismen hebben bacteriën ijzer nodig om te kunnen overleven. Virulente *E. coli* stammen zoals APEC hebben speciale ijzeropname-systemen ontwikkeld om ondanks de beperkte ijzerbeschikbaarheid toch te kunnen voldoen aan hun ijzerbehoefte. De energie hiervoor wordt geleverd door het TonB-ExbB-ExbD eiwitcomplex.^{7,8}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van gg-APEC varianten die zijn geproduceerd in Duitsland. De gg-APEC mutanten zijn gebaseerd op twee Nederlandse *E. coli* O78 stammen (geïsoleerd in 2010 en 2014), waarbij tenminste één van de genen coderend voor eiwitten van het TonB-ExbB-ExbD complex is gedeleteerd. Daarnaast bevatten de stammen deleties in genen (*tolQ* en *tolR*) die coderen voor eiwitten van het Tol-Pal systeem. Het Tol-Pal systeem is belangrijk voor de stabiliteit van het buitenmembraan in gramnegatieve bacteriën.⁹ Verschillende combinaties van deleties ($\Delta tonB$, $\Delta exbB-exbD$, $\Delta tolQ-tolR$) zullen worden getest om te onderzoeken welke combinatie leidt tot een optimale attenuatie.

De aanvrager wil de gg-APEC varianten produceren in conventionele of Single Use Bioreactoren (SUB's) tot 100 liter. Vervolgens zullen kippen geïnfecteerd worden met de gg-APEC mutanten gevolgd door 'challenge' experimenten met wildtype *E. coli* APEC en wordt de veiligheid en

werkzaamheid onderzocht. Aan het einde van de studie zullen de kippen opgeofferd worden en vindt analyse van cellen en weefsels plaats. De aanvrager stelt voor om de *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau en de *in vivo* activiteiten in associatie met kippen op DM-II inperkingsniveau.

4. Eerder COGEM advies

E.coli stammen met uitzondering van de niet-pathogene stammen B, C, K12 en W worden volgens bijlage 4.2 van de Regeling in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld. De COGEM heeft eerder geadviseerd over de markttoelating van een levend vaccin bestaande uit gg-APEC (Poulvac *E. coli*).

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. Overwegingen en advies

6.1 Classificatie APEC

APEC veroorzaakt colibacillose in onder andere kippen, kalkoenen, eenden en fazanten.^{1,3} De COGEM is niet bekend met voorbeelden van directe transmissie van APEC van dier naar mens. Ondanks dat APEC nauw verwant is aan het humane ExPEC, worden er geen infecties bij bijvoorbeeld personeel werkzaam in slachterijen waargenomen.³ Om deze redenen beschouwt de COGEM APEC als strikt dierpathogeen.

De bacterie is enzoïtisch aanwezig. APEC infectie bij vogels veroorzaakt ademhalingsproblemen, verminderde eetlust, vertraagde groei en in ernstige gevallen leidt het tot bloedvergiftiging en (in minder dan 5% van de gevallen) tot de dood. Systemische infecties treden voornamelijk op bij verzwakte dieren zoals gestreste en immuungecompromitteerde dieren en jonge vogels. Dieren die besmet zijn met IBV of *Mycoplasma* zijn ook kwetsbaar.^{1,4}

Er zijn verschillende geneesmiddelen beschikbaar tegen APEC. Zo kan een infectie worden behandeld met antibiotica of voorkomen worden door immunisatie met een levend vaccin (Poulvac E. coli).^{4,10}

Op basis van de hierboven genoemde eigenschappen adviseert de COGEM APEC als strikt dierpathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

6.2 Inschaling productiewerkzaamheden van gg-APEC

De aanvrager wil productiewerkzaamheden uitvoeren met de gg-APEC deletiemutanten (*tonB*, *exbB*, *exbD*, *tolQ*-*tolR*) in conventionele of Single Use Bioreactoren (SUB's) tot 100 liter. In de gg-APEC varianten is tenminste één van de genen coderend voor eiwitten van het TonB-ExbB-ExbD complex gedeleteerd.

Eerdere deletiestudies hebben aangetoond dat TonB essentieel is voor de virulentie van APEC. De deletiemutanten blijven nog wel in de bovenste luchtwegen van de gastheer aanwezig, maar zijn niet meer invasief.¹¹ Ook is aangetoond dat kippen gevaccineerd met APEC Δ *tonB* mutanten beschermd zijn tegen colibacillose.¹² Voor functionaliteit is TonB afhankelijk van de eiwitten ExbB en ExbD.^{13,14} Op grond hiervan is de COGEM van mening dat de gg-APEC mutanten geattenuëerd zijn.

Het is niet geheel uit te sluiten dat de mutanten kunnen reverteren tot wildtype door genetische uitwisseling zoals plasmide-overdracht, maar de COGEM is van mening dat dit niet zal leiden tot een bacterie met een hogere pathogeniteitsklasse dan een wildtype APEC stam.

Gezien de indeling van APEC in pathogeniteitsklasse 2 en op basis van de bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM om de productiewerkzaamheden met gg-APEC deletiemutanten

op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Om infecties via wondjes en verspreiding te voorkomen acht zij de aanvullende voorschriften noodzakelijk:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw gedragen.

6.3 Handelingen met kippen in associatie met gg-APEC en animale cellen

De aanvrager is van plan om kippen te infecteren met de geattenueerde gg-APEC mutanten om de veiligheid en werkzaamheid van de bacteriën als veterinair vaccin te onderzoeken.

De gg-APEC mutanten kunnen door de besmette kippen worden uitgescheiden via uitwerpselen en aërogeen worden verspreid. Overdracht kan plaatsvinden via stofdeeltjes of besmet drinkwater en voedsel.¹ De geattenueerde gg-APEC mutanten zijn niet invasief en kunnen alleen de bovenste luchtwegen van de gastheer infecteren.¹¹

Gezien het feit dat APEC is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 en omdat de kans zeer klein is dat de geattenueerde gg-APEC mutanten zich kunnen verspreiden en ziekte zullen veroorzaken onder gevogelte, adviseert de COGEM de voorgenomen *in vivo* werkzaamheden uit te voeren op DM-II inperkingsniveau. Daarbij kan zij instemmen met de in de aanvraag voorgestelde aanvullende voorschriften:

- De huisvesting van en alle handelingen met de dieren vinden plaats in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw gedragen.

Na afloop van de infectieproeven is de aanvrager voornemens analyses uit te voeren op cellen en weefsels van de kippen. De COGEM adviseert werkzaamheden met animale cellen in te schalen op inperkingsniveau ML-II met inachtneming van de aanvullende voorschriften:

- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw gedragen.

7. Conclusie

Indien de voorgenomen werkzaamheden op de geadviseerde inperkingsniveaus en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Lister SA & Barrow P (2008). *Enterobacteriaceae*. In: Poultry diseases, sixth edition, Ed. Pattison M *et al.*, Elsevier Ltd, Amsterdam
2. Bélanger L *et al.* (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 62: 1-10

3. Johnson TJ *et al.* (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* 189: 3228-3236
4. Guabiraba R & Schouler C (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* 362
5. Persoons D. *et al.* (2011) Een update van colibacillose bij kippen. *Vlaams Dier. Tijd.* 80: 161-166
6. Dziva F & Stevens MP (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37: 355-366
7. Schalk IJ *et al.* (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol. Microbiol.* 54: 14-22
8. Andrews SC *et al.* (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237
9. Cascales E *et al.* (2001). The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* 42: 795-807
10. European medicines agency. Poulvac *E. coli*.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/002007/vet_med_000259.jsp&mid=WC0b01ac058008d7a8 (bezoekt: 2 november 2016)
11. Holden KM. *et al.* (2012). TonB is essential for virulence in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 129-138
12. Holden KM *et al.* (2014). Avian pathogenic *Escherichia coli* Δ tonB mutants are safe and protective live-attenuated vaccine candidates. *Vet. Microbiol.* 173: 289-298
13. Ollis AA *et al.* (2012). The ExbD periplasmic domain contains distinct functional regions for two stages in TonB. *J. Bacteriol.* 194:3069-3077
14. Bulathsinghala CM *et al.* (2013). ExbB cytoplasmic loop deletions cause immediate, proton motive force-independent growth arrest. *J. Bacteriol.* 195: 4580-4591