

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 21 december 2017
KENMERK CGM/171221-01
ONDERWERP Advies classificatie *Desulfitobacterium hafniense*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een verzoek van Syngip B.V. om de bacterie *Desulfitobacterium hafniense* op Bijlage 2, lijst A1 te plaatsen (IG 17-242_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacterie *Desulfitobacterium hafniense* en de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratorium-condities met het betreffende micro-organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan. Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieu-risicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

D. hafniense komt in de bodem voor en is resistent tegen het 'laatste redmiddel' antibioticum vancomycine. Mens, dier en plant komen veelvuldig met de bacterie in aanraking, maar de COGEM heeft geen aanwijzingen dat *D. hafniense* bij deze organismen ziekte veroorzaakt. Zij is daarom van oordeel dat de bacterie niet pathogeen is, en adviseert *D. hafniense* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat *D. hafniense* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

De COGEM is ook door Bureau ggo gevraagd generiek te adviseren over de plaatsing van apathogene bacteriën die in het bezit zijn van vancomycineresistentie coderende genenclusters op Bijlage 2, lijst A1. Mede gezien de complexiteit van deze vraag, acht zij de adviestermijn (twee weken) te kort om een onderbouwd generiek advies over dit onderwerp op te kunnen stellen. Zij zal hier daarom op een later moment advies over uitbrengen.



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 IenW

Pathogeniteitsclassificatie van de bodembacterie

Desulfitobacterium hafniense

COGEM advies CGM/171221-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Syngip B.V. (IG 17-242) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Desulfitobacterium hafniense* en plaatsing van deze bacterie op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

D. hafniense is intrinsiek resistent tegen het 'laatste redmiddel' antibioticum vancomycine.^{2,3} Wegens deze eigenschap heeft Bureau GGO de COGEM aanvullend gevraagd of '*apathogene micro-organismen die van nature een gencluster bevatten dat codeert voor vancomycineresistentie in aanmerking komen voor plaatsing op bijlage 2 lijst A1?*'. Tevens heeft Bureau GGO de vraag gesteld: '*Zo ja, zou dit ook het geval zijn indien de vancomycine resistentie op een (van nature) voorkomend plasmide DNA voorkomt en de kans op horizontale genoverdracht groter wordt dan wanneer de vancomycineresistentie zich in het genoom bevindt?*'.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in oenschouw 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.

3. Achtergrondinformatie over *Desulfitobacterium hafniense* en vancomycineresistentie

3.1 *Desulfitobacterium hafniense*

D. hafniense is een al dan niet gebogen, staafvormige, grampositieve, strikt anaerobe bacterie, die hittebestendige sporen kan vormen.^{4,5,6,7} De bacterie is voor het eerst in 1996 in de wetenschappelijke literatuur beschreven en werd aanvankelijk *Desulfitobacterium frappieri* genoemd.^{4,5} *D. hafniense* wordt aangetroffen in met gehalogeneerde koolwaterstoffen en arseen vervuild(e) bodem, slib en sediment (Europa, Japan, Noord-Amerika), en is onder meer in staat zware metalen te reduceren en chloor bevattende koolwaterstoffen te dechloreren.^{4,5,6,7,8} De bacterie is ook éénmalig in kleine hoeveelheden uit feces van de mens geïsoleerd.⁹

D. hafniense is intrinsiek resistent tegen het antibioticum vancomycine doordat de bacterie over het zogenaamde *vanI* operon beschikt. Dit operon is chromosomaal gelegen en bestaat uit een aantal bij elkaar behorende genen die gezamenlijk vancomycineresistentie bewerkstelligen.^{2,3} Het genoom van verschillende *D. hafniense* stammen is gekarakteriseerd en is ongeveer 5,5 Mbp groot.¹⁰

3.2 Vancomycine

Vancomycine wordt als 'laatste redmiddel' toegepast bij de behandeling van levensbedreigende infecties met grampositieve bacteriën, waaronder de behandeling van infecties met bacteriën die resistent zijn tegen andere antibiotica, zoals methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).^{11,12} Het antibioticum is niet geschikt voor de behandeling van infecties met gramnegatieve bacteriën omdat deze van nature omhuld worden door een buitenmembraan dat uit lipopolysaccharide (LPS) bestaat, wat niet voor vancomycine permeabel is.¹³

Het werkingsmechanisme van vancomycine berust op de remming van de celwandsynthese. Het antibioticum omhult de D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) termini van de peptidoglycaan'precursors', waardoor deze worden afgeschermd voor transpeptidases. Hierdoor wordt de 'crosslinking' in het peptidoglycaan verhinderd, destabiliseert de celwand en lyseert de bacterie.¹³

Vancomycine is een glycopeptide dat van nature door bodembacteriën gesynthetiseerd wordt.¹³ Door middel van dit mechanisme verdringen zij de concurrerende groei van andere micro-organismen. Om de schadelijke werking van hun eigen antibioticumproductie en die van hun concurrenten tegen te gaan, beschikken sommige bodemmicro-organismen van nature over antibioticumresistentiegenen. Zo produceren bijvoorbeeld de bodembacteriën *Actinoplanes teichomyceticus* en *Streptomyces toyocaensis* vancomycine, en beschikken zij over een operon dat voor vancomycineresistentie codeert.¹³

3.3 Vancomycineresistentie

Resistentie tegen vancomycine berust op verschillende mechanismen.^{12,14} Eén van deze mechanismen betreft de inductie van een alternatieve metabole route voor de synthese van peptidoglycaan, waardoor er andere peptidoglycaan'precursors' worden gevormd met een lagere bindingsaffiniteit voor vancomycine.^{3,12,13} De termini van deze precursors bestaan uit D-Ala-D-lactaat (D-Ala-D-Lac) of D-Ala-D-serine (D-Ala-D-Ser), in plaats van D-Ala-D-Ala. Er zijn meer dan 10 operons beschreven die voor dit resistentiemechanisme coderen: *vanA* tot en met *vanG*, *vanI*, en *vanL* tot en met *vanN*. Het D-Ala-D-Lac resistentietype is geassocieerd met de operons *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanF*, *vanI* en *vanM*. Het D-Ala-D-Ser resistentietype is geassocieerd met de operons *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* en *vanN*.³

Binnen de operons van het D-Ala-D-Lac resistentietype zijn genen die coderen voor een D-lactaat dehydrogenase dat pyruvaat omzet in lactaat, een ATP-afhankelijk ligase dat betrokken is bij de synthese van het D-Ala-D-Lac, en een peptidase dat het in de cel aanwezige D-Ala-D-Ala klieft, essentieel.^{2,15,16,17} Het D-Ala-D-Lac operon komt bij bodembacteriën voor, zoals *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Desulfotobacterium*, *Paenibacillus* en *Streptomyces* soorten.^{3,18,19} Daarnaast komt het operon ook voor bij bacteriën in het maagdarmkanaal, zoals *Enterococcus faecalis* en *Enterococcus faecium*, en bij andere pathogene grampositieve coccen, zoals de vancomycine-resistente *S. aureus* (VRSA).

Op basis van fylogenetische analyse van de DNA-sequenties van de verschillende D-Ala-D-Lac resistentie-operons blijkt dat er twee clusters te onderscheiden zijn.³ Cluster I bevat operons die onder meer aangetroffen worden bij vancomycineresistente enterococcen (VRE) en VRSA. Cluster II bevat bacteriën die taxonomisch in een ander fyllum ingedeeld zijn dan de bacteriën van cluster I, en betreffen onder meer *D. hafniense*, *A. teichomyceticus* en *S. toyocaensis*.³

De *van* operons die bij vancomycineresistentie van de pathogene grampositieve coccen VRE en VRSA betrokken zijn, liggen op overdraagbare elementen (conjugatieve plasmiden of transposons).^{12,20,21} Op basis van sequentie-analyses van het *vanI* operon van *D. hafniense* zijn er geen aanwijzingen dat deze

zich op mobiele genetische elementen bevinden.³ Daarnaast is aangetoond dat het D-Lac dehydrogenase gen van *D. hafniense*, geen deel uit maakt van het *vanI* operon. Van het gen zijn meerdere homologen op het genoom aanwezig, maar deze zijn op andere locaties gelegen, en niet in de nabijheid van het *vanI* genencluster.^{2,3}

4. Eerder COGEM advies en classificaties andere beoordelende instanties

De COGEM heeft eerder geadviseerd de soorten in het genus *Desulfitobacterium* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.^{22,23} Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN), De Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA), en de Duitse 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS) hebben *D. hafniense* ingedeeld in de laagste risicogroep (groep 1).^{24,25,26} De BAUA beoordeelt pathogeniteit voor de mens. De FOEN en ZKBS nemen pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw. De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

5. Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voor handen.

D. hafniense komt wereldwijd voor in de bodem. Er zijn geen publicaties bekend waarin de bacterie aangemerkt wordt als ziekteverwekkend voor mens, dier of plant. Op basis hiervan is de COGEM van oordeel dat *D. hafniense* niet pathogeen is. Zij adviseert daarom *D. hafniense* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

D. hafniense is intrinsiek resistent tegen vancomycine. Het operon dat voor deze resistentie codeert, is chromosomaal gelegen. Er zijn geen aanwijzingen dat het genencluster naar andere bacteriën overdraagbaar is.^{2,3} De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat de vancomycineresistentie zich verspreidt naar andere (pathogene) bacteriesoorten. De COGEM merkt daarnaast op dat het operon niet verschilt van andere van nature voorkomende antibioticaresistentie coderende genenclusters, zoals de LPS-biosynthesegenen van gramnegatieve bacteriën. Het voornoemde in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *D. hafniense* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

6. Aanvullende opmerking

De COGEM is tevens door Bureau ggo gevraagd of apathogene bacteriën, die van nature een genencluster bezitten dat codeert voor vancomycineresistentie, in aanmerking komen voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van Regeling ggo. De COGEM is van oordeel dat een verhoogde kans op verspreiding in het milieu van genenclusters die coderen voor antibioticumresistentie, ongewenst is. Zij wijst er op dat er diverse mechanismen ten grondslag liggen aan de horizontale overdracht van bacteriële genetische elementen.^{27,28,29,30,31,32} Gezien de huidige antibioticumresistentieproblematiek, waaronder die van vancomycineresistentie bij grampositieve bacteriën, en de complexiteit van deze

vraag, acht zij de adviestermijn voor deze algemene adviesvraag van Bureau GGO (twee weken) te kort om hierover een onderbouwd generiek advies op te kunnen stellen. Zij zal daarom op een later moment over dit deel van de adviesvraag adviseren.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezoekt: 12 december 2017)
2. Kalan L *et al.* (2009). Noncanonical vancomycin resistance cluster from *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Antimicrobial Agents Chemother.* 53: 2841-2845
3. Kruse T *et al.* (2014). *VanI*: a novel D-Ala-D-Lac vancomycin resistance gene cluster found in *Desulfitobacterium hafniense*. *Microbial Biotechnol.* 7: 456-466
4. Bouchard B *et al.* (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1010-1015
5. Niggemyer A *et al.* (2001). Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5568-5580
6. Suyama A *et al.* (2001). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1474-1481
7. Furkuwa F *et al.* (2005). Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.* 32: 534-541
8. Villemur R *et al.* (2006). The *Desulfitobacterium* genus. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 706-733
9. Van de Pas BA *et al.* (2001). A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols. *Arch. Microbiol.* 175: 389-394
10. Kruse T *et al.* (2017). Comparative genomics of the genus *Desulfitobacterium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. Doi: 10.1093/femsec/fix135
11. Swartz MN (1994). Hospital-acquired infections: Diseases with increasingly limited therapies. *PNAS* 91: 2420-2427
12. Gardete S & Thomasz A (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 7: 2836-2840
13. Hubbard BK & Walsh CT (2003). Vancomycin assembly: Nature's way. *Angew. Chem.* 7: 730-765
14. Arias CA & Murray BE (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev.* 10: 266-278
15. Marshall CG *et al.* (1998). Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2215-2220
16. Depardieu F *et al.* (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 79-114
17. Hong HJ *et al.* (2008). Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631: 200-213

18. Guardabassi L *et al.* (2005). Glycopeptide resistance *vanA* operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4227-4233
19. D'Costa VM *et al.* (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477: 457-462
20. Woodward N (2001). Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in Enterococci. *Microb. Drug Resist.* 7: 229-236
21. Weigel LM *et al.* (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569-1571
22. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
23. COGEM (2017). Actualisatie van de lijsten met de indeling in pathogeniteitsklassen van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/170923-03
24. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2015). Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html (bezocht: 17 december 2017)
25. Federal Office for the Environment (2013). Classification of organisms. www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html (bezocht: 17 december 2017)
26. Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (2013). https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/03_Organismenliste/gentechnik_zkbs_organismenliste_node.html (bezocht: 17 december 2017)
27. Hawkey PNM & Jones AM (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: Suppl. 1, i3-i10
28. Palmer KL *et al.* (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 632-639
29. Roberts AP & Mullany P (2011). Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 856-871
30. Fernández Lanza V *et al.* (2014). The plasmidome of Firmicutes: Impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiol. Spectrum* 3: PLAS-0039-2014
31. Gillings MR (2014). Integrons: Past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78: 257-277
32. Cooper RM (2017). Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *eLIFE*: 1-26 DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.25950>