

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

**DATUM** 4 april 2019  
**KENMERK** CGM/190404-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden met gg-*E. coli* en gg-*S. Typhimurium*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 19-021\_IIk-000 getiteld 'Evaluation of the efficacy of APP2 vaccines (laboratory activities)' van de Stichting Wageningen Research deelt de COGEM u het volgende mee.


**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met een genetisch gemodificeerde (gg-) *Escherichia coli* en een gg- *Salmonella* Typhimurium stam. De gg-bacteriën brengen antigenen van de bacterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 tot expressie, met als doel een vaccin tegen de bij varkens voorkomende longziekte 'actinobacillaire pleuropneumonie' te ontwikkelen.

De in *E. coli* en *S. Typhimurium* ingebrachte DNA-sequenties coderen voor het O-antigeen van *A. pleuropneumoniae* type 2, en resistentie tegen het antibioticum kanamycine. Daarnaast is in de *E. coli* een sequentie ingebracht die codeert voor een fusie-eiwit dat is samengesteld uit fragmenten van twee door *A. pleuropneumoniae* type 2 geproduceerde toxines.

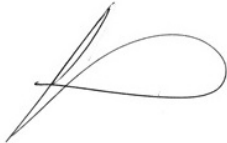
De COGEM heeft alle drie de ouderorganismen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Zij heeft geen redenen om aan te nemen dat de ingebrachte sequenties de pathogeniteit van de gebruikte *E. coli* en *S. Typhimurium* stammen verhogen. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren. Tevens adviseert zij - conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen - enkele aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen, ten einde te voorkomen dat de gg-bacteriën in het milieu verspreid worden.

Onder inachtneming van het genoemde inperkingsniveau en de aanvullende werkvoorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij 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.           Dr. J. Westra, Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden dr. D. Goovaerts, dr. B. P. H. Peeters en dr. T. G. Kimman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Inschaling laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* en *Salmonella* Typhimurium

## COGEM advies CGM/190404-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Escherichia coli* en gg- *Salmonella* Typhimurium (IG 19-021). De gg-bacteriën brengen antigene determinanten van de bacterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* tot expressie, met als doel een vaccin tegen 'actinobacillaire pleuropneumonie' (APP) te ontwikkelen. APP is een longziekte die bij varkens voorkomt.

#### 1.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*A. pleuropneumoniae* is een gram-negatieve coccoïde staafvormige facultatief anaërobe bacterie die tot de familie van de *Pasteurellaceae* behoort.<sup>1,2</sup> De bacterie is pathogeen voor varkens en veroorzaakt bij deze dieren de zeer besmettelijke long- en borstvliesontsteking APP die onder meer gepaard gaat met necrose en de dood tot gevolg kan hebben.<sup>3,4</sup> Transmissie van *A. pleuropneumoniae* vindt plaats via aërosolen en (in)direct contact.<sup>3</sup> Er zijn verschillende virulentiefactoren die aan de pathogenese van *A. pleuropneumoniae* bijdragen, zoals de Apx exotoxines en het lipopolysaccharide (LPS).<sup>1,3,4,5,6,7,8</sup>

Er zijn vier Apx toxines beschreven (Apx I t/m IV). Deze exotoxines worden door de bacteriën uitgescheiden zodra zij zich aan de longepitheelcellen gehecht hebben, en zijn schadelijk voor alveolaire epitheel- en endotheelcellen, rode bloedcellen, neutrofiele granulocyten en macrofagen.<sup>3,4,5,8</sup>

LPS is een endotoxine en maakt deel uit van het buitenste deel van de celmembraan van gramnegatieve bacteriën. LPS van *A. pleuropneumoniae* is betrokken bij de adherentie, kolonisatie en biofilmvorming in geïnfecteerd longweefsel.<sup>8,9,10,11</sup> Daarnaast versterkt LPS het schadelijke effect van de Apx toxines, induceert het de cytokineproductie door de cellen van het immuunsysteem, en induceert het necrose van de longepitheelcellen.<sup>8</sup>

#### 1.2 *Escherichia coli*

*E. coli* is een gram-negatieve staafvormige facultatief anaërobe bacterie die behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae*.<sup>12</sup> De bacterie komt primair als commensaal voor in de darmflora van warmbloedigen, zoals de mens en (landbouw)huisdieren. Daarnaast wordt *E. coli* door de aanwezigheid van besmette uitwerpselen in de bodem en oppervlaktewateren aangetroffen.<sup>13,14,15</sup> *E. coli* is gewoonlijk niet ziekteverwekkend, maar bepaalde varianten zijn pathogeen voor mens en dier.<sup>16</sup> De bacterie wordt via de fecaal-orale route overgedragen (voedselvergiftiging), door middel van contact met besmette mensen of dieren, of via besmette voorwerpen.<sup>17,18</sup> In een omgeving met veel stof (kippenboerderijen) kan de aviaire pathogene *E. coli* via inademing colibacillose bij kippen veroorzaken.<sup>19</sup>

### 1.3 *Salmonella* Typhimurium

*S. Typhimurium* is een specifiek subtype (serovar) van een ondersoort van *Salmonella enterica*, en heeft als volledige naam *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.<sup>20,21</sup> Het is een gram-negatieve staafvormige facultatief anaërobe bacterie die behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae*.<sup>22</sup> *S. Typhimurium* is een darmpathogeen van warmbloedigen (onder meer de mens en (landbouw)huisdieren), maar komt ook als commensaal bij dieren voor.<sup>22,23,24,25</sup> De bacterie wordt door de aanwezigheid van besmette uitwerpselen in de bodem en oppervlaktewateren aangetroffen, en via de fecaal-orale route (voedselvergiftiging), door middel van contact met besmette mensen of dieren, of via besmette voorwerpen overgedragen.<sup>22,23,24,26</sup> Onder experimentele condities is over korte afstanden aëroge transmissie aangetoond bij gespeende varkens.<sup>27</sup>

## 2. Genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* en *Salmonella* Typhimurium

In een specifieke *E. coli* en *S. Typhimurium* stam zijn DNA-sequenties van *A. pleuropneumoniae* ingebracht. Het acceptororganisme *E. coli\_5* is afkomstig van de tonsillen van een gezond varken. De aanvrager geeft aan dat met behulp van PCR is aangetoond dat de stam negatief is voor de virulentiefactoren 'stx, eae, LT en ST'. Het acceptororganisme *S. Typhimurium* SL1344 is een virulente, algemeen gebruikte laboratoriumstam die geïsoleerd is uit geïnfecteerd vee.<sup>25,28</sup>

In *E. coli\_5* en *S. Typhimurium* SL1344 is door middel van homologe recombinatie een biosynthesecluster coderend voor het O-antigeen van LPS van *A. pleuropneumoniae* serotype 2 geïnsereerd.<sup>29</sup> Dit biosynthesecluster is uitgewisseld met het endogene biosynthesecluster van de acceptororganismen. In het ingebrachte fragment (~15 kbp) is als selectiemarker een kanamycine resistentie-expressiecassette aanwezig.

Daarnaast is in de *E. coli\_5* stam door middel van homologe recombinatie een expressiecassette ingebracht (~3 kbp) die codeert voor een fusie-eiwit. Dit fusie-eiwit is samengesteld uit een deel van het 'OmpA' buitenmembraaneiwit van *E. coli*, een deel van het ApxII en ApxIII toxine van *A. pleuropneumoniae*, en een histidine-tag bestaande uit 10 residuen. Door de recombinatie is een deel van het endogene OmpA coderende gen uit *E. coli\_5* verdwenen.

De aanvrager geeft aan dat het fragment van het ApxII toxine bestaat uit aminozuren 439-801 (ApxIIA#5),<sup>30</sup> en het fragment van het ApxIII toxine bestaat uit aminozuren 27-245. De eerste 160 aminozuren van de N-terminus van ApxIII zijn mogelijk betrokken bij de cytotoxische eigenschappen van het toxine.<sup>5</sup> De ApxII en ApxIII toxinefragmenten beschikken beiden over immunogene eigenschappen.<sup>5,30,31,32</sup> Het ApxIIA#5 fragment kan bij dieren (muizen, varkens) neutraliserende antilichamen opwekken.<sup>30,32</sup>

## 3. Voorgenomen werkzaamheden

De voorliggende vergunningsaanvraag betreft de inschaling van de isolatie van bacteriën uit *post-mortem* longweefsel van biggen die onder experimentele omstandigheden met gg-*E. coli\_5* of gg-*S. Typhimurium* SL1344 gevaccineerd zullen worden. Na vaccinatie worden de biggen tijdens dezelfde studie intranasaal of door middel van aërosolen aan *A. pleuropneumoniae* serotype 2 blootgesteld. De

vaccinatie van de biggen en de besmetting met *A. pleuropneumoniae* vallen onder een andere vergunningsaanvraag die niet ter advisering voorligt.

#### 4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *A. pleuropneumoniae* en *S. Typhimurium* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>33</sup> *E. coli* heeft zij eveneens in klasse 2 ingedeeld, met uitzondering van de hemolytische syndroom geassocieerde *E. coli* (HUSEC), die de COGEM in klasse 3 heeft ingedeeld.<sup>16,33</sup> Daarnaast zijn de geattenuerde *E. coli* laboratoriumstammen B, C, K12 en W ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.

#### 5. Overwegingen

De voorgenomen werkzaamheden betreffen handelingen met een gg-*E. coli* en gg-*S. Typhimurium* stam waarin DNA-sequenties van *A. pleuropneumoniae* zijn ingebracht. De COGEM heeft *S. Typhimurium* en *A. pleuropneumoniae* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. *E. coli* is eveneens in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld, met uitzondering van bepaalde varianten. De *E. coli\_5* stam is geen specifieke geattenuerde laboratoriumstam, maar geïsoleerd van de tonsillen van een gezond varken. De bacterie is niet geassocieerd met het veroorzaken van het hemolytisch syndroom. De COGEM beschouwt de *E. coli\_5* stam als een organisme van pathogeniteitsklasse 2.

In *E. coli\_5* en *S. Typhimurium* SL1344 is een operon coderend voor het O-antigeen van LPS van *A. pleuropneumoniae* serotype 2 ingebracht. LPS is opgebouwd uit lipid A, een core-oligosaccharide segment, en een O-specifiek polysaccharide (O-antigeen). Het O-antigeen bestaat uit repeterende suikereenheden. De aanvrager stelt dat in LPS alleen lipid A de pathogeniteit beïnvloedt, en verwacht daarom dat een wijziging in het O-antigeen geen verandering in de pathogeniteit van de acceptororganismen zal bewerkstelligen. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat tijdens een recent in het buitenland uitgevoerde vaccinatiestudie bij biggen, waarbij dezelfde gg-bacteriën zijn gebruikt, de biggen niet ziek zijn geworden ten gevolge van de vaccinatie.

De COGEM is van oordeel dat gegevens uit de literatuur er op wijzen dat het O-antigeen van *A. pleuropneumoniae* niet essentieel is voor aanhechting aan varkenscellen.<sup>34,35</sup> Tevens draagt het O-antigeen niet bij aan de virulentie van deze bacterie.<sup>36,37</sup> De COGEM heeft daarom geen redenen om aan te nemen dat gg-*E. coli\_5* en gg-*S. Typhimurium* SL1344 op grond van de insertie van het O-antigeen biosynthesecluster pathogener zijn dan hun ouderorganismen.

In het biosynthesecluster is als selectiemarker een kanamycineresistentiegen ingebracht. De COGEM is van oordeel dat dit resistentiegen niet van invloed is op de pathogeniteit van de gg-bacteriën, en dat daarom de pathogeniteit hierdoor eveneens niet verhoogd is ten opzichte van de ouderorganismen.

In gg-*E. coli\_5* is naast het O-antigeen operon ook een expressiecassette ingebracht die codeert voor een fusie-eiwit samengesteld uit een fragment van ompA van *E. coli*, en fragmenten van de ApxII en ApxIII toxines van *A. pleuropneumoniae*. De aanvrager stelt dat de ApxII en ApxIII fragmenten niet coderen voor toxische of pathogene componenten.

De COGEM merkt op dat de ingebrachte ApxII en ApxIII toxinefragmenten over immunogene eigenschappen beschikken. Daarnaast kan het ApxIIA#5 fragment bij muizen en varkens neutraliserende antilichamen opwekken. Mede gezien het feit dat tijdens een recente vaccinatiestudie in het buitenland waarbij dezelfde gg-bacteriën zijn gebruikt, de gevaccineerde biggen niet ziek zijn geworden, heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat het tot expressie gebrachte fusie-eiwit de pathogeniteit van gg-*E. coli\_5* doet toenemen.

## 6. Advies

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat alle ingebrachte eigenschappen de pathogeniteit van acceptororganismen *E. coli\_5* en *S. Typhimurium* SL1344 niet verhogen. Zij adviseert daarom voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De COGEM merkt op dat *E. coli* en *S. typhimurium* oro-fecaal en via gebruiksvoorwerpen (fomites) door middel van kruiscontaminatie overgedragen kunnen worden. Ten einde uitsleep van de gg-bacteriën te voorkomen, adviseert zij conform Bijlage 9.1.1.3.3.12 en 9.1.1.3.3.13 van de Regeling genetische gemodificeerde organismen,<sup>38</sup> tijdens handelingen met de gg-bacteriën handschoenen te dragen en open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse II. Onder in acht neming van dit inperkingsniveau en de bovengenoemde aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen handelingen verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. Pohl S *et al.* (1983). Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. System. Bacteriol.* 33: 510-514
2. Christensen H & Bisgaard M (2018). Classification of genera of *Pasteurellaceae* using conserved predicted protein sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 2692-2696
3. Bossé JT *et al.* (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Inf.* 4: 225-235
4. Loera-Muno A & Angulo C (2018). New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 217: 66-75
5. Seah JN & Kwang J (2004). Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 22: 1494-1497
6. Chung JW *et al.* (2007). Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *Proteomics* 7: 1854-1865
7. Jacques M (2004). Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 68: 81-85
8. Chiers K *et al.* (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.* 41: 65-81

9. Bélanger M *et al.* (1990). Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* tot porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* 58: 3523-3530
10. Rioux S *et al.* (1997). Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.* 35: 139-144
11. Hathroubi S *et al.* (2016). Impact of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm mode of growth on the Lipid A structures and stimulation of immune cells. *Innate Immun.* 22, 353–362
12. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [www.bacterio.net/escherichia.html](http://www.bacterio.net/escherichia.html) (bezocht: 1 april 2019)
13. Schaechter M (2009). *Escherichia coli*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
14. Tenaillon O *et al.* (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207-217
15. Savageau MA (1983). *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Nat.* 122: 732-744
16. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie *Escherichia coli*. COGEM advies CGM/170828-01
17. Bahrani-Bougeot FK *et al.* (2009). Enteropathogenic infections. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
18. Mead PS & Griffin PM (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352: 1207-1212
19. 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
20. Ezaki T *et al.* (2000). Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 945-947
21. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [www.bacterio.net/salmonellanom.html#contents](http://www.bacterio.net/salmonellanom.html#contents) (bezocht: 1 april 2019)
22. Fabrega A & Vila J (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.*: 26: 308-341
23. Herrero-Fresno A & Olsen JE (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiol.* 71: 98-110
24. Hoelzer K *et al.* (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.*42: 34-61
25. Branchu P *et al.* (2018). Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect. Immun.* 86. doi: 10.1128/IAI.00079-18
26. Gorham TJ & Lee J (2016). Pathogen loading from Canada geese faeces in freshwater: potential risks to human health through recreational water exposure. *Zoonoses Public Health* 63: 177-190
27. Oliveira CJB *et al.* (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* 134: 199-209
28. Hoiseth SK & Stocker BAD (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239

29. Xu Z *et al.* (2010). Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* 192: 5625-5636
30. Shin M-K *et al.* (2013). Induction of protective immune responses against challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by oral administration with *Saccharomyces cerevisiae* expressing Apx toxins in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151: 132-139
31. Lee SH *et al.* (2014). A recombinant chimera comprising the R1 and R2 repeat regions of *M. hyopneumoniae* P97 and the N-terminal region of *A. pleuropneumoniae* ApxIII elicits immune responses. *BMC Vet. Res.* 10: 43-55
32. Seo KW *et al.* (2011). Characterization of antigenic determinants in ApxIIA exotoxin capable of inducing protective immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge. *Immunol. Invest.* 40: 465-480
33. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
34. Rioux S *et al.* (1999). Isolation and characterization of mini-*Tn* 10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.* 45: 1017-1026
35. Boekema BKHL *et al.* (2003). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 93: 133-144
36. Labrie J *et al.* (2002). Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J. Endotoxin Res.* 8: 27-38
37. Ramjeet M *et al.* (2005). Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *47: 39104-39114*
38. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-04-01> (bezocht: 2 april 2019)