

Advies betreffende: **Experimentele maagdarminfecties met recombinante verotoxine-coderende bacteriofagen in herkauwers'**

Kennisgever: **Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Instituut voor Dierhouderij en Dier-gezondheid**

COGEM kenmerk
CGM/030924-01

BGGO nummer
GGO 03-136

Datum advies
26 september 2003

Inleiding

Verotoxine producerende *Escherichia coli* (VTEC) zijn in de afgelopen decennia verantwoordelijk voor een groot deel van de maagdarminfecties bij de mens. Verotoxine producerende *E. coli* kunnen waterige diarree, bloederige diarree of hemorragische colitis veroorzaken. Het meest frequent geïdentificeerde VTEC serotype is *E. coli* 0157:H7, welke geassocieerd is met het hemolytisch uremisch syndroom (HUS). Dit syndroom gaat gepaard met een ernstig ziektebeeld met een mortaliteit van 2 tot 7%. Mensen kunnen geïnfecteerd worden door VTEC als gevolg van het eten van besmet vlees dat niet voldoende verhit is geweest om aanwezige bacteriën te doden. Vlees kan besmet raken tijdens het slachten van vee door contact met VTEC geïnfecteerde darmen en uitwerpselen (3). Van nature zijn in de pens van herkauwers VTEC aanwezig (6). Verotoxine dragende bacteriofagen, welke een soort virussen zijn met een specificiteit voor bacteriën, kunnen *E. coli* infecteren waardoor VTEC ontstaan.

Verotoxine staan ook bekend als Shiga-like toxine (Stx) aangezien het structureel en functioneel hetzelfde toxine is dat geproduceerd wordt door *Shigella dysenteriae* (7). Van het verotoxine zijn twee vormen bekend, verotoxine 1 (Stx1) en verotoxine 2 (Stx2). Verotoxine 2 is op aminozuur niveau slechts 50-60% homolog aan verotoxine 1 en is geassocieerd met een ernstigere ziektevorm (1). Het werkingsmechanisme van het verotoxine is binding aan een specifieke receptor (Gb3) op het oppervlak van endotheelcellen, gladde spiercellen, niercellen of rode bloedcellen. Eenmaal in de cel blokkeert het verotoxine de intracellulaire eiwitsynthese als gevolg van modificatie van ribosomen. Dit leidt uiteindelijk tot celdood. De bepaling van de toxiciteit van het verotoxine is niet eenduidig (1; 2). Literatuurgegevens wijzen op een LD₅₀ van 884 ng/kg bij een intraveneuze toediening bij konijnen (2). Dit heeft tot gevolg dat het toxine ingedeeld kan worden in de op één na hoogste toxiciteitsklasse, namelijk T-2 (5).

Het doel van het onderzoek is om onder laboratoriumomstandigheden en ingeperkte dierverblijven inzicht te krijgen in de verspreidingsmogelijkheden van verotoxine 2 dragende bacteriofagen in *E. coli* in een *in vivo* situatie. Het verotoxine kan worden

overgedragen door bacteriofagen die drager zijn van het verotoxine operon. In de te gebruiken lambdaïde recombinante faag (Φ 24B::Kan) is het verotoxine operon (vt2A) geïnactiveerd door de insertie van een antibioticum resistentiegen (kanamycine resistentie) in het verotoxine gen. Hierdoor kan volgens de aanvrager geen verotoxine worden geproduceerd. Het kanamycine resistentiegen (KmR) kan gebruikt worden om bacteriën die geïnficeerd zijn met bacteriofagen in de darmflora te detecteren. De recombinante bacteriofagen worden toegediend aan schapen zodat ze de aanwezige *E. coli* bacteriën in het maagdarmstelsel kunnen infecteren. De uitwerpselen van de geïnficeerde schapen worden getest op de aanwezigheid en hoeveelheid kanamycine resistente bacteriën, welke een maat is voor het voorkomen van infectie en inzicht geeft in de verspreidingsmogelijkheden van verotoxine dragende bacteriofagen in schapen.

Overwegingen en Advies

De recombinante bacteriofaag Φ 24B::Kan is geconstrueerd door een kanamycine resistentiegen in het verotoxine operon (vt2A) van de faag te kloneren. De aanvrager stelt dat door plaatsing van een kanamycine resistentie cassette (KmR) in het vt2A gen er niet langer een toxisch genproduct wordt gevormd en dat het construct waarin het KmR is geplaatst stabiel is. De aanvragers geven geen experimentele onderbouwing om de conclusie te trekken dat door de disruptie van het verotoxine gen geen toxisch genproduct meer gevormd wordt. Echter, in de literatuur zijn diverse studies bekend die dezelfde constructen gebruiken om het verotoxine gen uit te schakelen (1; 4). De COGEM is van mening dat door plaatsing van de KmR cassette in het verotoxine operon nagenoeg uitgesloten is dat een toxisch genproduct geproduceerd kan worden, aangezien een niet functioneel eiwit gevormd zal worden.

De aanvrager geeft aan dat de bacteriofaag Φ 24B::Kan middels een techniek van plaque zuivering onder hoge selectiedruk geïsoleerd is (1). Recombinante bacteriofagen zijn in staat om *E. coli* gastheren te infecteren maar kunnen geen verotoxine produceren. Wild type bacteriofagen kunnen echter wel verotoxine produceren. Een van de vragen van Bureau GGO aan de COGEM is of de gehanteerde zuiveringsmethode voldoende is om in het te gebruiken lysaat uitsluitend bacteriofagen te hebben waarin het vt2A gen geïnactiveerd is. De COGEM is van mening dat het door de aanvragers gebruikte protocol voor de zuivering van recombinante bacteriofagen voldoende is. In het protocol wordt gebruik gemaakt van PCR testen en sequentie analyses (4). Kwaliteitscontrole met behulp van een zogenaamde PCR test is volgens de COGEM de optimale manier om wild type bacteriofagen te detecteren. Hoewel als gevolg van een detectielimiet, die elke kwaliteitscontrole test met zich meebrengt, niet volledig uitgesloten kan worden dat wild type bacteriofagen aanwezig zullen zijn, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar. De eventueel aanwezige zeer kleine hoeveelheden niet-gerecombineerde bacteriofagen zullen immers identiek zijn aan het uitgangsmateriaal,

wild type bacteriofagen, die van nature in het milieu voorkomen. Daarbij betreft het hier experimenten onder ingeperkt gebruik waarbij nagenoeg uitgesloten is dat verdere verspreiding in het milieu op zal treden als gevolg van de gekozen inperkingsmaatregelen.

In de literatuur zijn voorbeelden bekend waaruit geconcludeerd kan worden dat stabiliteit van bacteriofagen nooit volledig gegarandeerd kan worden (1). Bacteriofagen afkomstig van een enkele voorouderbacteriofaag kunnen aanleiding geven tot verschillende profielen van immunoreacties en restrictiepatronen. In theorie is het dus ook mogelijk dat door genetische instabiliteit recombinante bacteriofagen hun insertie verliezen. Door de gebruikte testmethoden om zo zuiver mogelijke recombinante bacteriofagen te verkrijgen, wordt in hoge mate uitgesloten dat wild type verotoxine producerende bacteriofagen in het lysaat zitten. In het ergste geval dat de kanamycine resistentie cassette door bijvoorbeeld recombinatie uit de bacteriofaag gesplitst wordt, kan een intact verotoxine operon gevormd worden. Echter, het verotoxine geproduceerd door een dergelijke teruggemuteerde bacteriofaag zal dezelfde toxiciteit en hetzelfde werkingsmechanisme hebben als de wild type bacteriofaag die van nature voorkomt in herkauwers (6). Daarnaast kan het theoretisch voorkomen de recombinante bacteriofaag de kanamycine resistentie cassette uitwisselt met een verotoxine operon van wild type bacteriofaag. Dit zou kunnen resulteren in het ontstaan van wild type bacteriofagen die het toxine gen kwijtgeraakt zijn en in plaats daarvan kanamycine resistentiegen hebben verkregen. Dit scenario is slechts mogelijk indien wild type bacteriofagen aanwezig zijn en de kleine kans zich voordoet dat een bacterie geïnfecteerd raakt met zowel een wild type als een recombinante bacteriofaag. Concluderend is de COGEM van mening dat de kans op genetische instabiliteit met als gevolg recombinatie minimaal zijn en dat met de door de vergunningverlener voorgestelde inperkingsmaatregelen (ML-II en DM-II) voldoende uitgesloten kan worden dat de genetisch gemodificeerde bacteriofaag, waarin een kanamycine resistentiegen gekloneerd is, in het milieu terecht zal komen en een gevaar zal vormen voor mens en milieu. Overigens wijst de COGEM erop dat zelfs bij het onwaarschijnlijke geval van doorbreking van de fysische inperking, de aanwezigheid van kanamycine resistente bacteriofagen niet significant zal bijdragen aan de pool van reeds aanwezige kanamycine resistente microben in de darmen van mensen of dieren (8; 9).

E. coli die geïnfecteerd is met het recombinante bacteriofaag is geen micro-organisme dat zich door de lucht kan verspreiden. Bij het nemen van vloeistofmonsters uit bijvoorbeeld de pens is er wel een reële kans op contaminatie aanwezig waardoor adequate inperkingmaatregelen vereist zijn. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu voldoende gewaarborgd zijn bij een inschaling op ML-II niveau voor handelingen met micro-organismen uit de pens en faeces van de proefdieren. Als aanvullend voorschrift stelt de COGEM voor dat het dragen van handschoenen verplicht is. Voor handelingen met schapen waarbij verotoxine deficiënte bacteriofagen worden toegediend heeft de aanvrager een fysische inperking en werkvoorschriften voorgesteld

die verder gaan dan het inschalingvoorstel van DM-II van Bureau GGO. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar indien de handelingen met proefdieren uitgevoerd worden op DM-II niveau. Deze inschaling is gebaseerd op het feit dat handelingen uitgevoerd worden met organismen die behoren tot pathogeniteitsklasse 2 en het feit dat het verotoxine operon geïnactiveerd is. Derhalve is de onderhavige inschaling niet gebaseerd op een intact verotoxine behorend tot toxiciteitsklasse T-2, welke een hogere inschaling tot gevolg zou hebben.

Referenties

1. Allison, H. E., Sergeant, M. J., James, C. E., Saunders, J. R., Smith, D. L., Sharp, R. J., Marks, T. S., and McCarthy, A. J. (2003). Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect Immun* **71**, blz. 3409-18.
2. Fujii, J., Kinoshita, Y., Yutsudo, T., Taniguchi, H., Obrig, T., and Yoshida, S. I. (2001). Toxicity of Shiga toxin 1 in the central nervous system of rabbits. *Infect Immun* **69**, blz. 6545-8.
3. Garber, L., Wells, S., Schroeder-Tucker, L., and Ferris, K. (1999). Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J Food Prot* **62**, blz. 307-12.
4. James, C. E., Stanley, K. N., Allison, H. E., Flint, H. J., Stewart, C. S., Sharp, R. J., Saunders, J. R., and McCarthy, A. J. (2001). Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. *Appl Environ Microbiol* **67**, blz. 4335-7.
5. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
6. Van Donkersgoed, J., Graham, T., and Gannon, V. (1999). The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet J* **40**, blz. 332-8.
7. Melton-Celso, A.R. and O'Brien, A.D. (1998). Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-128. In J.B. Kaper and A.D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM, Washington D.C.
8. Levy, S. B., Marshall, B., Schluederberg, S., Rowse, D., and Davis, J. (1988). High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, blz. 1801-6.
9. Nap, J. P., Bijvoet, J., and Stiekema, W. J. (1992). Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res* **1**, blz. 239-49.