

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

**Cogem**  
postbus 578  
3720 AN Bilthoven

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk  
IG 02-272/03.co1

Uw brief van  
1 maart 2006

Kenmerk  
CGM/060314-05

Datum  
14 maart 2006

Onderwerp  
Omlaagschaling van werkzaamheden met *Rhodococcus equi*

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende een wijzigingsverzoek van de Rijksuniversiteit Groningen op de bestaande vergunning IG 02-272/03 deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO voor werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde bacterie *Rhodococcus equi* (*R. equi*). De experimenten zijn erop gericht om in wildtype *R. equi* selectief genen of genenclusters, betrokken bij het primaire en secundaire koolstof-, energie- en stikstofmetabolisme te inactiveren met behulp van homologe recombinatie.

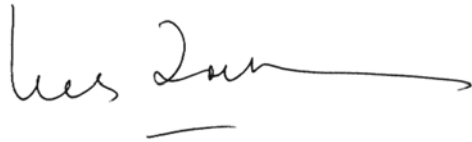
De COGEM heeft in het verleden *R. equi* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De aanvrager heeft gevraagd om de soort *R. equi* te beschouwen als een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 1 en hij verzoekt om handelingen met genetisch gemodificeerde *R. equi* uit te mogen voeren op een lager inperkingsniveau: ML-I in plaats van ML-II.

De COGEM is van mening dat niet aan de voorwaarden voor omlaagschaling wordt voldaan. De soort *R. equi* is ziekteverwekkend, er is geen 'lange historie van veilig gebruik' en de aanvrager maakt geen gebruik van stammen met een bewezen verminderd virulent of avirulente karakter óf van geattenueerde stammen. Daarbij is er slechts een beperkte kennis over de epidemiologie, pathogenese en transmissieroutes van dier naar mens en van mens naar mens.

De COGEM adviseert om, conform de Regeling GGO, de vervaardiging van en handelingen met genetische gemodificeerde *R. equi*, in te schalen op ML-II niveau.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bastiaan Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. R.C. Zwart

# Verzoek om omlaagschaling voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Rhodococcus equi*

COGEM advies CGM/060314-05

## Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Rhodococcus equi*.

De experimenten zijn erop gericht om in wildtype *R. equi* selectief genen of genclusters, betrokken bij het primaire en secundaire koolstof-, energie- en stikstofmetabolisme te inactiveren met behulp van homologe recombinatie via autologe (bacterie-eigen) sequenties. In de vorm van niet-replicerende plasmiden worden genen(clusters) ingebracht met als doel het inactiveren van (het) geselecteerde gen(en) in *R. equi*. Ter vaststelling van hun groeifotypes zullen de genetisch gemodificeerde *R. equi* in vloeistofcultures of op voedingsbodems worden opgegroeid.

## *Rhodococcus equi*

De bacterie *Rhodococcus equi* is een pathogene, niet-sporenvormende gram-positieve coccobacillus die wereldwijd, met uitzondering van Antarctica, algemeen in de bodem voorkomt. De bacterie wordt ook aangetroffen in zout- en zoetwater (1). De bacterie is in staat heftige infecties te veroorzaken bij veulens. De ziekte wordt gekenmerkt door chronische longontsteking en darmslijmvliesontsteking en een hoge sterfte onder veulens van één tot vier maanden oud (2,3). Hoewel *R. equi* ook in andere zoogdieren, zoals varkens, katten en honden, wordt aangetroffen zijn dergelijke infecties ongewoon. *R. equi* wordt voor deze dieren als een opportunistische ziekteverwekker beschouwd (4).

Het inhaleren van stofdeeltjes besmet met *R. equi*, vormt naast opname van grond en mest bij grazen, de voornaamste bron van besmetting (2,3,4). Op stoeterijen en boerderijen waar paarden worden gehouden, wordt de bacterie in zowel bodem als mest in aanzienlijke aantallen aangetroffen. Hoewel de bacterie wijdverspreid is binnen de paardenpopulatie openbaart de ziekte zich zeer beperkt. Slechts op een relatief klein aantal stoeterijen en boerderijen is de ziekte endemisch of komt de ziekte sporadisch voor (3). De belangrijkste reden hiervoor is de aanwezigheid van virulente stammen in combinatie met, voor de bacterie, gunstige milieuomstandigheden. Infecties komen verhoogd voor in gebieden met hoge temperaturen gedurende de zomermaanden, zanderige bodems en veel stof (2,3).

Stammen van *R. equi* worden onderscheiden in drie virulentieniveaus: volvirulent, middelmatig virulent en avirulent. Volvirulente *R. equi* stammen worden gekenmerkt

door de aanwezigheid van een plasmide van 80 tot 90 kb met een gen coderend voor een 15 tot 17-kDa virulentie-geassocieerd eiwit (VapA) dat zich aan de oppervlakte van de bacterie bevindt. Virulente *R. equi* stammen zijn aangetroffen in de longen en darmen van zieke veulens en in de bodems en mest van bedrijven waar de ziekte endemisch is. Middelmatig virulente stammen worden gekenmerkt door een plasmide van 79 tot 100 kb en een 20-kDa virulentie-geassocieerd eiwit (VapB). Middelmatig virulente stammen zijn aangetroffen in de lymfe van varkens. In avirulente stammen worden bovengenoemd plasmiden en eiwitten niet aangetroffen. Deze laatste stammen komen algemeen voor in de bodem.

### *Humane infectie*

Het aantal humane infecties met *R. equi*, is zeer beperkt (1,5,6). De eerste humane infectie met *R. equi* werd in 1967 gerapporteerd en tot 1983 bleef, wereldwijd, het totale aantal infecties van *R. equi* beperkt tot dertien ziektegevallen. Na 1983 werd een relatief sterke toename gevonden, meer dan 100 ziektegevallen werden er gerapporteerd tot 2003. Deze toename wordt toegeschreven aan het toenemende aantal AIDS-patiënten, patiënten die een orgaantransplantatie ondergaan en ontwikkelingen in kankerbestrijding (1).

De meerderheid van de patiënten geïnfecteerd met *R. equi* is immunodeficiënt. Tweederde vanwege een infectie met HIV, de overige vanwege orgaantransplantaties, alcoholisme of aandoeningen als chronisch nierfalen, longkanker, leukemie en diabetes. Opmerkelijk is dat bij de meerderheid van de AIDS-patiënten een volvirulente of middelmatig virulente *R. equi* stam werd aangetroffen, maar bij patiënten waarbij de immunodeficiëntie een ander oorzaak had, voornamelijk avirulente stammen werden aangetroffen (4,6).

Bij ruim 80% van de gevallen manifesteert de ziekte zich in een longontsteking en in een groot aantal gevallen heeft de ziekte een dodelijke afloop. Het sterftecijfer na infectie met *R. equi* voor HIV-geïnfecteerde personen bedraagt 50-55%, voor niet-HIV-geïnfecteerde immunodeficiënte patiënten 20-25%.

Overdracht van mens op mens is eenmalig waargenomen. Twee HIV-geïnfecteerde patiënten raakten besmet nadat zij in het ziekenhuis een kamer hadden gedeeld met een HIV-geïnfecteerde persoon die besmet was met *R. equi* (5).

*R. equi* veroorzaakt slechts in een zeer beperkt aantal gevallen een infectie in immunocompetente personen. Tot 2001 waren slechts negentien gevallen bekend.

Onder de patiënten bevond zich een laboratoriummedewerker. Hij voerde gedurende meerdere jaren experimenten uit met *R. equi* in combinatie met organische oplosmiddelen. In zijn longen werd lokaal holtevorming aangetroffen en door de longen verspreid meerdere granuloompjes die toegeschreven werden aan de infectie met *R. equi* (7).

Twee immunocompetente patiënten overleden, waarbij onduidelijk was of *R. equi* als de directe doodsoorzaak aangewezen kon worden (3,5).

### **Adviesvraag**

Hoewel de aanvrager aangeeft dat *R. equi* een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 is, verzoekt hij om de werkzaamheden uit te mogen voeren op een lager inperkingsniveau, dan op basis van de pathogeniteitsklasse zou worden vastgesteld. In plaats van op ML-II-niveau wil de aanvrager zijn experimenten uitvoeren in een ML-I ruimte. Hij onderbouwt zijn verzoek om omlaagschaling met de volgende argumenten. *R. equi* is een algemeen voorkomende bodembacterie en een opportunistisch ziekteverwekker in veulens. Hoewel contact tussen mensen en de bacterie *R. equi* (virulente en avirulente stammen) frequent plaatsvindt, treden infecties slechts zeer sporadisch op en dan vrijwel alleen in patiënten met een sterk verzwakt immuunsysteem. Infecties in schijnbaar immunocompetente mensen zijn gerapporteerd, maar zijn extreem zeldzaam, en meestal het gevolg van lichamelijk letsel.

De COGEM is gevraagd of zij ermee kan instemmen dat vervaardigen van en handelingen met genetisch gemodificeerde *R. equi* onder ML-I-omstandigheden kunnen plaatsvinden.

### **Overweging en advies**

De COGEM heeft in het verleden *R. equi* aangemerkt als een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 (8). Een micro-organisme wordt in klasse twee ingeschaald als het voldoet aan de volgende voorwaarden:

*micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren een ziekte kan veroorzaken (8).*

Het vervaardigen van en handelingen met genetisch gemodificeerde micro-organismen van deze pathogeniteitsklasse dienen, conform de Regeling GGO, plaats te vinden op ML-II-niveau. Om tot pathogeniteitsklasse 1 te behoren moet een micro-organisme voldoen aan één van de volgende voorwaarden:

- *Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;*
- *Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;*

- *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 virulentie;*
- *Van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond (8).*

De COGEM is van mening dat aan geen van bovengenoemde voorwaarden wordt voldaan. De soort *R. equi* is ziekteverwekkend en er is geen 'lange historie van veilig gebruik'. Bovendien zijn binnen de soort *R. equi*, stammen bekend waarin specifieke virulentiefactoren zijn aangetoond (15-17 kDa antigenen).

Binnen de paardenhouderij wordt *R. equi* als een belangrijk bedrijfsgebonden probleem ervaren. Hoewel het aantal fokkerijen met infecties van volvirulente infecties relatief laag is, neemt het aantal geleidelijk toe en blijft de ziekte op veel van deze bedrijven endemisch aanwezig (3).

Ook het aantal humane infecties neemt toe. Het betreft hier zowel infecties bij immunodeficiënte als immunocompetente personen. Daarbij gaat het bij de laatste groep niet uitsluitend om infecties na trauma (4,5).

Bij de meerderheid van de patiënten is onduidelijk op welke wijze zij besmet zijn geraakt. Bij slechts één derde van de patiënten bleek het mogelijk om de infectie toe te schrijven aan contact met paarden of varkens (1). Twee (immunodeficiënte) patiënten werden geïnfecteerd via overdracht van mens op mens (1). Vermoedt wordt dat het inhaleren van besmette (bodem)deeltjes de belangrijkste bron van infectie is. Ook de besmetting van een immunocompetente laboratoriumwerker, waardoor deze forse ademhalingsproblemen en longlesies kreeg, lijkt door inhalatie van *R. equi* te zijn ontstaan (7).

De COGEM is van mening dat er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn over de epidemiologie, pathogenese en transmissieroutes van dier naar mens en van mens naar mens om de soort *R. equi* als niet gevaarlijk te beschouwen en omlaag te schalen naar pathogeniteitsklasse 1. Noch om de werkzaamheden op ML-I te laten plaatsvinden.

Een uitzondering op inschaling in pathogeniteitsklasse 2 kan een bacteriestam zijn waarvoor aangetoond is dat deze een sterk verminderd tot niet virulent karakter heeft óf sterk geattenuëerd is.

Overigens moet opgemerkt worden dat de huidige indeling van virulentie waarbij onderscheidt wordt gemaakt tussen, volvirulente, middelmatig virulente en avirulente stammen gebaseerd is op de virulentie in veulens. De indeling vindt plaats op basis van de aan- of afwezigheid van virulente plasmiden met genen coderend voor virulentie-geassocieerd eiwitten (VapA of VapB). De aanwezigheid van deze virulentie-factoren lijkt minder dominant van belang bij humane infecties. Humane infecties worden niet uitsluitend veroorzaakt door *R. equi* stammen met virulente plasmiden, maar ook door avirulente *R. equi* stammen die deze geïdentificeerde

virulentiefactor niet bezitten. De huidige kennis van pathogenese en virulentiefactoren bij humane infecties lijkt onvoldoende om een onderscheid te kunnen maken tussen wel en niet humaan pathogene stammen. Virulentie voor mensen van stammen zal dan ook gedocumenteerd moeten worden op andere gronden dan alleen de afwezigheid van VapA of VapB.

Uit de door de aanvrager aangeleverde data blijkt met welke stammen hij werkt, de vergunningaanvrager geeft uitsluitend aan dat hij de soort *R. equi* als gastheer wil gebruiken. De aanvrager geeft niet aan dat hij met specifieke (geattenueerde) stammen werkt. De experimenten zijn erop gericht om in *R. equi* selectief genen of genclusters, betrokken bij primair en secundaire koolstof- en energiemetabolisme te inactiveren. Deze genen(clusters) zijn mogelijk betrokken bij de virulentie, maar kunnen ook slechts ten dele of helemaal niet bijdragen aan virulentie.

De COGEM ziet derhalve geen aanleiding om de betreffende werkzaamheden op een lager inperkingsniveau dan ML-II in te schalen.

#### *Advies*

De COGEM is van mening dat er geen aanwijsbare redenen zijn om de soort *R. equi* van pathogeniteitsklasse 2 omlaag te schalen naar klasse 1 of *R. equi* stammen te beschouwen als een klasse 1. De COGEM adviseert om, conform de Regeling GGO, de vervaardiging van en handelingen met genetische gemodificeerde *R. equi*, in te schalen op ML-II niveau.

## Referenties

- (1) Weinstock DM, Brown AE. 2002. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin Infect Dis. Vol.15;34(10):1379-85
- (2) Takai S, Ohbushi S, Koike K, Tsubaki S, Oishi H, Kamada M. 1991. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. J Clin Microbiol. Vol.29(12):2887-9.
- (3) Giguere S, Prescott JF. 1997. Strategies for the control of *Rhodococcus equi* infections on enzootic farms. AAEP Proceedings. Vol.43:65-70.
- (4) Takai S, Martens RJ, Julian A, Garcia Ribeiro M, Rodrigues de Farias M, Sasaki Y, Inuzuka K, Kakuda T, Tsubaki S, Prescott JF. 2003. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. J Clin Microbiol. 41(9):4468-70.
- (5) Kedlaya I, Ing MB, Wong SS. 2001. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. Clin Infect Dis. 1;32(3):E39-46.
- (6) Takai S, Tharavichitkul P, Takarn P, Khantawa B, Tamura M, Tsukamoto A, Takayama S, Yamatoda N, Kimura A, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Maneekarn N, Sirisanthana T, Kirikae T. 2003. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. J Infect Dis. 188(11):1717-23.
- (7) Egawa T, Hara H, Kawase I, Masuno T, Asari S, Sakurai M, Kishimoto S. 1990. Human pulmonary infection with *Corynebacterium equi*. Eur Respir J. 3(2):240-2.
- (8) Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling 1998.