

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 12 november 2019  
**KENMERK** CGM/191112-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*  
stammen RN4220 en 8325-4

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld ‘*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; stammen RN4220 & 8325-4’ (IG 19-281\_2.13-000), ingediend door het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van twee stammen van de bacteriesoort *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, RN4220 & 8325-4. *S. aureus* subsp. *aureus* is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, maar de aanvrager verzoekt de *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 in te delen in pathogeniteitsklasse 1, aangezien deze stammen attenuerende mutaties bevatten. *S. aureus* bevat een groot arsenaal aan virulentiefactoren, zoals toxines. *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 bevatten verschillende mutaties ten opzichte van wildtype *S. aureus*, waardoor bepaalde virulentiefactoren niet of verminderd tot expressie komen.

De COGEM is van oordeel dat in beide stammen de belangrijkste virulentiefactoren om een infectie tot stand te brengen niet of sterk verminderd tot expressie komen, en infectie van gezonde personen onwaarschijnlijk is. De laboratoriumstammen worden al lange tijd in laboratoria gebruikt voor onderzoek, zonder (bekende) problemen. Ook is herstel van alle functies in de twee stammen zeer onwaarschijnlijk.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM om *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 in te delen in pathogeniteitsklasse 1, en op te nemen in Bijlage 2 lijst A1 van Regeling ggo.



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, Hoofd Bureau ggo  
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

*Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. A.C. Fluit van het Universitair Medisch Centrum Utrecht.*

# **Pathogeniteitsclassificatie van de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4**

## **COGEM advies CGM/191112-01**

### **1. Inleiding**

Naar aanleiding van een verzoek van het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestammen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* RN4220 en 8325-4 (IG 19-281), en de plaatsing van deze bacteriestammen op Bijlage 2 lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).<sup>1</sup> Bijlage 2, lijst A1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier en plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities 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 (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieu-risicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

### **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.

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 micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

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. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus***

*Staphylococcus aureus* is een Gram-positieve bacterie die voor kan komen als commensaal op huid, slijmvliezen en in de neus bij gezonde mensen en dieren.<sup>2</sup> Zo'n 20 tot 30% van de wereldpopulatie draagt de bacterie bij zich in de neus.<sup>3,4,5</sup> Kolonisatie door de bacterie is in het algemeen niet schadelijk voor de gastheer, maar *S. aureus* kan in sommige gevallen dieper gelegen weefsels bereiken. Infectie met *S. aureus* kan verschillende gevolgen hebben. In gezonde mensen kan *S. aureus* verschillende huidinfecties, abscessen, of in zeldzame gevallen pyomyositis (infectie van skeletspieren) of necrotiserende fasciitis/pneumonie (infectie in onderhuids vetweefsel of in de longen) veroorzaken. Ook kan de bacterie door medische ingrepen infecties veroorzaken.<sup>5,6</sup> Personen met een verlaagde weerstand lopen een groter risico op nadelige gevolgen van infectie. Dit kan in sommige gevallen leiden tot sepsis of multi-orgaanfalen. In melkvee is *S. aureus* een bekende veroorzaker van chronische mastitis.

*S. aureus* bevat een groot arsenaal aan virulentiefactoren, zoals toxines en enzymen (bijvoorbeeld coagulase) die het mogelijk maken om het immuunsysteem te ontwijken.<sup>7</sup> Genen die coderen voor de virulentiefactoren bevinden zich veelal op mobiele genetische elementen in het *S. aureus* genoom, zoals profagen, plasmiden, of pathogeniteitseilanden. Ook worden er nog steeds nieuwe virulentiefactoren ontdekt en beschreven.<sup>8</sup> Verschillende regulator-loci hebben invloed op de productie van virulentiefactoren, waarvan de belangrijkste het 'accessory gene regulator' (*agr*) locus en het 'staphylococcal accessory regulator' (*sar*) locus zijn.<sup>9</sup>

#### **3.1 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* stam 8325-4**

De *S. aureus* subsp. *aureus* stam NCTC8325-4 (ook wel RN450 genoemd) is afgeleid van het klinische isolaat NCTC8325 (in 1960 geïsoleerd uit een patiënt met sepsis<sup>10</sup>), waar drie profagen (P11, 12 en 13) uit verwijderd zijn door middel van UV-licht behandeling.<sup>11,12</sup> Ook hebben er nog verschillende andere mutaties plaatsgevonden in 8325-4 ten opzichte van 8325, waaronder twee 'single-nucleotide polymorphisms' (SNPs) in het 'phenol soluble modulín' (PSM) operon  $\alpha 3$  (PSM $\alpha 3$ ), een kleine (11 bp) deletie in het in *rsbU* gen gelegen in het sigma B ( $\sigma B$ ) operon, en een mutatie in het *tcaR* gen. Daarnaast is het *tst* gen, dat codeert voor het 'Toxic shock syndrome' (TSS) toxine-1 (TSST-1), afwezig in 8325-4.<sup>13,14</sup>

De mutatie in het PSM $\alpha$ 3 operon zorgt ervoor dat er geen functioneel PSM $\alpha$ 3 gevormd kan worden. PSM $\alpha$ 3 is een virulentiefactor die onder andere betrokken is bij chemotaxis, het lyseren van bepaalde witte bloedcellen en de vorming van biofilm.<sup>15</sup> De mutatie in het  $\sigma$ B operon zorgt ervoor dat  $\sigma$ B (een regulatorgen van virulentiefactoren<sup>9</sup>) verminderd tot expressie komt, waardoor de expressie van verschillende virulentiefactoren verstoord wordt.<sup>12,15</sup> Door de mutatie in het *tcaR* gen wordt TcaR getrunceerd en inactief, waardoor de transcriptie van virulentiefactor *sarS* verminderd wordt.<sup>15</sup>

Binnen de 8325-4 stam bestaan verschillende varianten die onderling genetische heterogeniteit laten zien. Zo is er binnen de *S. aureus* subsp. *aureus* stam 8325-4 variatie als het gaat om hemolysine coderende genen.<sup>15,16</sup>

### 3.2 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* stam RN4220

RN4220 is afgeleid van NCTC8325-4 en is verkregen na behandeling van 8325-4 met UV- en nitrosoguanidine-mutagenese (MNNG). RN4220 is een veelgebruikte laboratoriumstam die gekarakteriseerd wordt door een mutatie in het *sauI* *hsdR* gen, waardoor deze stam niet meer in het bezit is van het restrictiemodificatiesysteem, en daardoor ontvankelijk is voor DNA afkomstig van andere bacteriën, zoals *Escherichia coli*. Ook is in RN4220, net als in 8325-4, de expressie van  $\sigma$ B verminderd en produceert RN4220 geen TSST-1.<sup>11,13,17</sup> Het is ook waarschijnlijk dat RN4220, evenals 8325-4, geen functioneel PSM $\alpha$ 3 kan vormen. Daarnaast bevat RN4220 een extra adenine-insertie in het *agrA* gen (in het *agr* operon) die een frameshift veroorzaakt waardoor het laatste aminozuur van AgrA veranderd en er drie aminozuren bijkomen. Hierdoor is RN4220 niet in staat  $\alpha$ - of  $\delta$ -hemolyse te produceren.<sup>11,16</sup> In Traber & Novick (2006) wordt beschreven dat deze adenine-insertie niet is veroorzaakt door MNNG mutagenese, maar waarschijnlijk ontstaan is in voorloperstam 8325-4 (de RN450-8A variant). Ook bevat RN4220 een aantal unieke mutaties ten opzichte van 8325-4 die de fitness (bijvoorbeeld in het gen *uvrC*), of de productie van virulentiefactoren (bijvoorbeeld in de 'clumping factor A' (*clfA*), of *essC* genen) negatief beïnvloeden.<sup>11,18</sup> Vanwege de hierboven benoemde mutaties in RN4220 wordt deze stam afgeraden voor virulentieonderzoek en is de stam geschikt voor het uitvoeren van onderzoek door middel van transformaties vanwege zijn 'restrictiedeficiëntie'.<sup>11</sup>

## 4 . Eerdere COGEM adviezen

*S. aureus* wordt onderverdeeld in twee subspecies, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* en subsp. *aureus*. De COGEM heeft *S. aureus*, en daarmee beide subspecies, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>19</sup> In 2004 heeft de COGEM een advies uitgebracht over een klinische studie met een gg-variant van de *S. aureus* stam NCTC 8325-4, waarin het gen voor Clumping factor B (ClfB) uitgeschakeld is.<sup>20</sup> In dit advies was de COGEM van oordeel dat de *S. aureus* stam 8325-4 verzwakt is qua pathogeniteit en virulentie ten opzichte van de wildtype *S. aureus* stam, vanwege de afwezigheid van virulentiegenen die een rol spelen bij ernstige huidinfecties of voedselvergiftiging, de afwezigheid van profagen, en de verminderde expressie van  $\sigma$ B waardoor expressie van verschillende virulentiefactoren verminderd is.<sup>12</sup>

## 5. Overweging

*S. aureus* en de daaronder vallende *S. aureus* subsp. *aureus* is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De aanvrager verzoekt de *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 in te delen in pathogeniteitsklasse 1, aangezien deze stammen attenuerende mutaties bevatten.

*S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 bevatten verschillende mutaties ten opzichte van wildtype *S. aureus*, waardoor bepaalde virulentiefactoren niet of verminderd tot expressie komen. Enkele belangrijke verschillen tussen 8325-4 en RN4220 in vergelijking met wildtype *S. aureus* zijn mutaties in *rbsU*, *agr*, en ook is het gen dat codeert voor TSST-1, een toxine dat menstruatie- of operatiegerelateerde potentieel fatale ziekten kan veroorzaken, afwezig in beide stammen.

De mutaties in de stammen RN4220 en 8325-4 zijn genetisch stabiel. De attenuerende puntmutaties ten gevolge van de UV-behandeling kunnen reverteren, maar met een zeer lage frequentie<sup>21</sup> en kunnen dus als stabiel worden beschouwd. De deletie van 11bp in *rsbU* is eveneens genetisch stabiel. De afwezigheid van profagen in RN4220 en 8325-4 is stabiel, tenzij de stammen in contact komen met *S. aureus* die deze profagen wel bevatten. Afwezigheid van *tst* is eveneens zeer stabiel, indien er geen contact is met stammen die het 'pathogenicity island' met dit gen bevatten. Echter, overdracht van dit pathogenicity island is mogelijk zeldzaam, omdat het beperkt voorkomt in *S. aureus* (pers. comm. externe expert). De *agr* mutatie in RN4220 is minder stabiel, omdat het een enkele base in een repeterende sequentie betreft, waar reversie vaak met een hogere frequentie optreedt. De COGEM acht het zeer onwaarschijnlijk dat alle mutaties en daarmee functies hersteld zouden worden.

De mutaties in *rsbU* en *agr* hebben in verschillende dieronderzoeken attenuerende effecten laten zien als het gaat om virulentie.<sup>22</sup> In muizen is aangetoond dat intraveneuze inoculatie met 8325-4 (*rsbU*-) significant minder ernstige artritis veroorzaakte en dat daarnaast de mate van mortaliteit, gewichtsafname en concentratie van de pro-inflammatoire cytokine IL-6 significant minder waren in vergelijking met de SH1000 stam, een stam afgeleid van 8325-4 waarin *rsbU* weer functioneel is (*rsbU*+).<sup>22</sup> In een andere studie bleek de virulentie van 8325-4 sterk verminderd ten opzichte van een klinisch isolaat van *S. aureus* na toediening aan beschadigd hoornvlies van muizen.<sup>23</sup> In experimenten met mensen waarbij de stam 8324-5 bij gezonde vrijwilligers in de neus is aangebracht ( $1 \times 10^7$  CFU), bleek dat 8325-4 binnen 30 dagen niet meer aantoonbaar was en werden er geen negatieve gezondheidseffecten gerapporteerd na inoculatie.<sup>24</sup> Ook zijn de stammen gevoelig voor alle gangbare antibiotica die gebruikt worden voor het bestrijden van *S. aureus* infecties (pers. comm. externe expert).

Uit de dierstudies blijkt dat de stammen alsnog infectie kunnen veroorzaken, weliswaar in veel mindere mate dan virulentere of wildtype *S. aureus* stammen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat in deze dierstudies hoge doseringen als inoculum gebruikt worden en de infectie niet via een natuurlijke infectieroute geschiedt, maar met behulp van doorbroken barrières (e.g., beschadigd hoornvlies, of intraveneuze toediening).

Niet alle virulentiegenen zijn in deze *S. aureus* subsp. *aureus* stammen uitgeschakeld of verminderd actief. De pathogeniteit van een organisme wordt echter bepaald door het totale repertoire van aanwezige virulentiefactoren. Individuele factoren zijn zelden voldoende om ziekte te veroorzaken. De COGEM is van oordeel dat in beide stammen de belangrijkste virulentiefactoren niet of sterk verminderd tot

expressie komen. Er zijn geen aanwijzingen dat de stammen RN4220 en 8325-4 nog de juiste set aan virulentiefactoren bezitten om ziekte te veroorzaken bij gezonde mensen of dieren. Onderzoek met 8325-4 in gezonde vrijwilligers heeft geen negatieve gezondheidseffecten aangetoond. De laboratoriumstammen worden al sinds de jaren '60 in laboratoria gebruikt voor onderzoek,<sup>12,10</sup> zonder (bekende) problemen. Daarnaast is herstel van alle functies in de stammen RN4220 en 8325-4 zeer onwaarschijnlijk. Alles in overweging nemende, concludeert de COGEM dat *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 in aanmerking komen voor indeling in pathogeniteitsklasse 1.

## 6. Advies

Samengevat adviseert de COGEM *S. aureus* subsp. *aureus* stammen RN4220 en 8325-4 in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat deze stammen in aanmerking komen voor plaatsing op Bijlage 2 lijst A1 van Regeling ggo.

## Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01> (bezoekt: 31 oktober 2019)
2. Lozano C *et al.* (2016). *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the African continent. *Microorganisms*, 4: 12
3. Lister JL & Horswill AR (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4: 178
4. Krismer B *et al.* (2017). The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 15: 675-687
5. Balasubramanian D *et al.* (2017). *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis.* 75: ftx005
6. Buchan KD *et al.* (2019). *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. *Microbiology.* 165: 367-385
7. Zhang X *et al.* (2017). Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. *Microbiol. Res.* 205: 19-24
8. De Jong NWM *et al.* (2019). Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019
9. Horsburgh MJ *et al.* (2002). Sigma B modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* 184: 5457-5467
10. Herbert S *et al.* (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun.* 78: 2877-2889
11. Nair D *et al.* (2011). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J. Bacteriol.* 193: 2332-2335
12. Novick R (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology.*, 33: 155-166

13. Andrey DO *et al.* (2015). Impact of the regulators *sigb*, *rot*, *sara* and *sars* on the toxic shock *tst* promoter and TSST-1 expression in *Staphylococcus aureus*. PLoS One, 10: e0135579
14. Kreiswirth BN *et al.* (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature, 305: 709-712
15. Bæk KT *et al.* (2013). Genetic variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 strain lineage revealed by whole-genome sequencing. PLoS One 8: e77122
16. Traber K & Novick R (2006). A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of *agr* and failure to translate delta- and alpha-haemolysins. Mol. Microbiol. 59: 1519-1530
17. Bonventre PF *et al.* (1993). Toxicity of recombinant toxic shock syndrome toxin 1 and mutant toxins produced by *Staphylococcus aureus* in a rabbit infection model of toxic shock syndrome. Infect Immun. 61: 793-799
18. Berscheid A *et al.* (2012). Revisiting the genomes of the *Staphylococcus aureus* strains NCTC 8325 and RN4220. Int. J. Med. Microbiol. 302: 84-87
19. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
20. COGEM (2004). Artificiële kolonisatie met Clumping factor B deficiënte *S. aureus* stammen in de neus. COGEM advies CGM/040224-04
21. Prunier AL *et al.* (2003). High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. J. Infect. Dis. 187: 1709-1716
22. Johnson IM *et al.* (2004). Sigma Factor B and *RsbU* are required for virulence in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. Infect Immun. 72: 6106-6111
23. Hume EB *et al.* (2005). A *Staphylococcus aureus* mouse keratitis topical infection model: cytokine balance in different strains of mice. Immunol. Cell Biol. 83: 294-300
24. Verkaik NJ *et al.* (2010). Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. Clin. Microbiol. Infect. 17: 343-848