

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

DATUM 04 maart 2020
KENMERK CGM/200304-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Escherichia coli* Nissle 1917

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Escherichia coli Nissle 1917' (IG 20-023_2.13-000), ingediend door de Technische Universiteit Delft, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), en de plaatsing van deze stam op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo. *E. coli* komt voornamelijk voor in de darmflora van warmbloedigen zoals de mens. Binnen de bacteriesoort *E. coli* zijn zowel pathogene als apathogene varianten te onderscheiden.

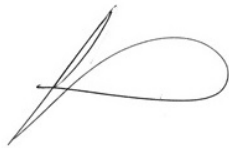
De *E. coli* bacteriestam EcN is in de Eerste Wereldoorlog tijdens een diarree-uitbraak geïsoleerd uit de ontlasting van een soldaat die als enige van zijn eenheid geen symptomen ontwikkelde. EcN beschikt over een sterke groeiremmende activiteit voor andere bacteriën en wordt al meer dan 100 jaar ingezet als probioticum ter voorkoming of behandeling van verschillende gastro-intestinale aandoeningen in pasgeborenen, kinderen en volwassenen (waaronder patiënten met gastro-intestinale aandoeningen). EcN beschikt over verschillende fitnessverhogende eigenschappen, en produceert verschillende sideroforen, twee microcines en het genotoxische colibactin, maar geen andere klassieke virulentiefactoren.

De stam heeft een lange historie van veilig gebruik. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *E. coli* Nissle 1917 infecties veroorzaakt bij dier, mens of plant. Wel kan het colibactin DNA schade veroorzaken in eukaryote cellen en is het in verband gebracht met het ontstaan van darmkanker. De COGEM adviseert daarom om *E. coli* Nissle 1917 in te delen in pathogeniteitsklasse 1, maar niet op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de 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

Pathogeniteitsclassificatie van de *Escherichia coli* bacteriestam Nissle 1917

COGEM advies CGM/200304-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de TU Delft is de COGEM gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Escherichia coli* Nissle 1917 (IG 20-023) en over de plaatsing van deze stam op Bijlage 2, lijst A1 van de 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 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 milieurisicobeoordeling 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 ogenschouw 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. *Escherichia coli*

E. coli bacteriën zijn Gram-negatieve staafvormige facultatief anaerobe bacteriën die behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae*.² *E. coli* komt primair als commensaal voor in de darmflora van warmbloedigen zoals de mens en (landbouw)huisdieren. Daarnaast wordt *E. coli* door fecale verontreiniging in de bodem en oppervlaktewateren aangetroffen.^{3,4,5} *E. coli* is een heterogene soort en kent zowel pathogene als apathogene varianten. De pathogene *E. coli* varianten worden onderverdeeld in extra-intestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) en intestinale pathogene *E. coli* (InPEC).⁶ Ook bestaan er varianten die specifiek ziekteverwekkend zijn voor vogels (aviaire pathogene *E. coli* of APEC),^{7,8} maar deze zijn niet in staat de mens te koloniseren.⁸

De ernst van de ziekteverschijnselen die *E. coli* kan veroorzaken, is afhankelijk van een aantal aspecten zoals de gastheer, predisponerende factoren en de virulentiefactoren van de bacterie.^{3, 9,10} In het algemeen kunnen *E. coli* infecties met behulp van antibiotica goed worden bestreden, maar infecties met multiresistente varianten komen steeds vaker voor.^{11,12}

E. coli wordt (doorgaans) aan de hand van biochemische omzettingsreacties gedetermineerd. Daarnaast vindt een verdere onderverdeling in groepen plaats, onder meer op basis van de genetische samenstelling, het serotype of het ziektebeeld. Serotypering vindt plaats op basis van verschillende geïdentificeerde buitenmembraanantigenen, zoals het K-antigeen (kapsel), O-antigeen (lipopolysacharide), H-antigeen (flagellen) en F-antigeen (fimbriae of pili).³

4. *E. coli* Nissle 1917

De *E. coli* bacteriestam Nissle 1917 (EcN, serotype O6:K5:H1) is tijdens de Eerste Wereldoorlog door professor Alfred Nissle uit de ontlasting van een jonge soldaat geïsoleerd.^{13,14,15} Deze soldaat was gestationeerd in een regio waar pathogene enterobacteriën heersten, met name bacteriën die behoren tot het geslacht *Shigella*. Opvallend was dat de soldaat als enige van zijn eenheid geen diarree of andere intestinale ziekte ontwikkelde. Vanuit een wetenschappelijke interesse in de antagonistische (groeiremmende) activiteit tussen bacteriën onderling, heeft Nissle nader onderzoek gedaan naar de *E. coli* stam uit deze patiënt (EcN). De stam bleek over een sterke antagonistische activiteit tegen verschillende pathogene enterobacteriën te beschikken. Op basis hiervan ontwikkelde Nissle het probioticum Mutaflor met EcN als actief ingrediënt, dat 100 jaar na de ontwikkeling nog steeds verkocht wordt.¹⁴

4.1 Genetische eigenschappen

In de laatste decennia is er meer fenotypisch en genetisch onderzoek gedaan naar de eigenschappen en bioveiligheid van de stam. EcN beschikt over twee kleine cryptische plasmiden (pMUT1 en pMUT2). Zowel het complete chromosomale DNA van EcN als dat van de plasmiden is gesequenced.^{16,17} Op basis van genoomanalyses is gebleken dat EcN nauw verwant is aan pathogene *E. coli* stammen, zoals de uropathogene CFT073.^{18,19} Genclusters voor de productie van toxines en andere klassieke virulentiefactoren (zoals α -hemolysine, 'P-, M- of S-fimbrial adhesins') van pathogene *E. coli* stammen zijn niet aangetoond in EcN.^{15,19,20,21} EcN bevat wel (net als CFT073) een gencluster ('*pks* island') coderend voor de productie van een hybride 'nonribosomale peptide-polyketide' genotoxine genaamd 'colibactin', dat megalocytosis (graduele vergroting) en schade in het DNA (door alkylering) kan veroorzaken in gekweekte zoogdiercellen. Colibactin wordt geassocieerd met de groei van darmtumoren.^{22,23} Het '*pks* island' gencluster is echter ook nodig voor de probiotische eigenschappen van EcN.^{18,24,25,26} In een studie is aangetoond dat van de personen waarbij geen darmaandoeningen zijn vastgesteld ongeveer 20% *E. coli* bacteriën bij zich draagt die een '*pks* island' bevatten.²⁷ Er is echter nog veel onduidelijk over de lange termijn effecten hiervan, en welke factoren nog meer een rol spelen bij de ontwikkeling van darmtumoren.

4.2 Fenotypische eigenschappen

EcN vormt een extracellulair kapsel (K5) dat immunomodulerende eigenschappen heeft.²⁸ Ook beschikt de stam over flagella van serotype H1, waardoor de bacterie zich voort kan bewegen, en drie verschillende typen fimbriae (F1A, F1C en 'curli' fimbriae), die adhesie aan darmepitheelcellen mediëren.¹⁵ Het O-antigeen in *E. coli* bacteriën is onder andere gecorreleerd aan serumgevoeligheid. Uit *in vitro* studies met EcN (O6) is gebleken dat deze stam gevoelig is voor humaan serum.^{29,30} De antagonistische activiteit van EcN tegen (pathogene) bacteriën wordt onder andere verklaard door de productie van twee antimicrobiële peptiden (microcins), namelijk microcin H47 en microcin M³¹ en de productie van veel verschillende sideroforen (ijzer-opname systemen).^{18,20}

4.3 Toepassingen bij mens en dier

Het toedienen van EcN aan patiënten met gastro-intestinale aandoeningen (zoals diarree) leidt in het algemeen niet tot infecties. Wel zijn in extreme gevallen nadelige effecten van EcN waargenomen. Zo is beschreven dat EcN ziekte en sterfte kan geven in sterk immuun-gecompromitteerde muizen waarin zowel het adaptieve immuunsysteem als het intestinale microbioom uitgeschakeld was.³² Ook is in één publicatie beschreven dat na toediening van EcN in een vroeggeboren baby (28 weken, <1 kg) met gastro-enteritis door een virale co-infectie (rotavirus en adenovirus), sepsis optrad en EcN aangetroffen werd in bloed.³³ Dit is echter een zeldzaam geval gebleken, aangezien er in verschillende andere studies is gebleken dat EcN effectief is in het verminderen van klachten en de aanwezigheid van pathogene enterobacteriën,^{15,20,34} ook bij jonge kinderen en neonaten, zonder ernstige bijwerkingen.^{35,36}

EcN is daarnaast in verschillende klinische studies toegediend aan patiënten met 'irritable bowel syndrome' (IBS) of verschillende varianten van 'inflammatory bowel diseases' (IBDs), zoals colitis ulcerosa (CU) en de ziekte van Crohn (CD), waarbij het darmslijmvlies chronisch ontstoken is en de afweer verstoord is.^{15,20,37,38,39} Hier blijkt EcN in het algemeen goed getolereerd te worden en is gebruik

van EcN bij CU even effectief gebleken als het standaard gebruikte geneesmiddel (mesalazine) bij het behouden van remissie.^{15,38,40,41,42} Ook bij varkens en kalveren is onderzoek gedaan naar EcN als profylaxe voor diarree, met positieve resultaten.^{15,43,44,45}

5. Eerder COGEM advies

In 2017 heeft de COGEM *E. coli* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, met uitzondering van *E. coli* stammen die geassocieerd zijn met het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS), die zij in pathogeniteitsklasse 3 heeft ingedeeld.⁴⁶ De COGEM heeft de *E. coli* stammen B, C, K12, en W ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.⁴⁷

6. Classificaties van andere organisaties

De Duitse 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS) die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, heeft *E. coli* Nissle 1917 ingedeeld in risicogroep 1.⁴⁸ De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

7. Overweging en advies

E. coli Nissle 1917 is een enterobacterie met een sterke antagonistische activiteit tegen pathogene bacteriesoorten. De stam beschikt over verschillende fitnessverhogende (antagonistische) eigenschappen, maar geen klassieke virulentiefactoren. Er zijn geen aanwijzingen dat deze stam pathogeen is voor dier, mens of plant. De stam wordt al meer dan 100 jaar gebruikt ter behandeling van gastro-intestinale aandoeningen in neonaten, kinderen, volwassenen (waaronder patiënten met (ernstige) gastro-intestinale aandoeningen) en heeft een lange historie van veilig gebruik. Wel bezit de stam het 'pks island' dat codeert voor productie van het pro-carcinogene colibactin. Ook in individuen zonder darmaandoeningen kunnen *E. coli* bacteriën aangetroffen worden die dit gencluster bevatten. De lange termijn effecten van dergelijke bacteriën zijn nog grotendeels onbekend en worden mogelijk ook mede bepaald door andere factoren.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om *E. coli* Nissle 1917 in te delen in pathogeniteitsklasse 1, maar niet op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezoekt: 12 februari 2020)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). www.bacterio.net/escherichia.html (bezoekt: 20 februari 2020)
3. Schaechter M (2009). *Escherichia coli*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
4. Tenailon O *et al.* (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207-217

5. Savageau MA (1983). *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Nat.* 122: 732-744
6. Kaper JB (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140
7. Lister SA & Barrow P (2008). *Enterobacteriaceae*. In: Poultry diseases, sixth edition, Ed. Pattison M *et al.*, Elsevier Ltd, Amsterdam
8. Johnson TJ *et al.* (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* 189: 3228-3236
9. Bahrani-Bougeot FK *et al.* (2009). Enteropathogenic infections. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
10. 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
11. McKenna M (2013). The last resort. *Nature* 499: 394-396
12. Bryce A *et al.* (2016). Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 352: i939
13. Nissle A (1925). Aus dem Hygienischen Institut und Untersuchungsamt in Freiburg i. B. Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflor-behandlung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 44: 1809-1813
14. Sonnenborn U (2016). *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 363. pii: fnw212
15. Sonnenborn U & Schulze J (2009). The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* 21: 122-158
16. Reister M *et al.* (2014). Complete genome sequence of the gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Biotechnol.* 187: 106-107
17. Blum-Oehler G *et al.* (2003). Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res. Microbiol.* 154: 59-66
18. Massip C *et al.* (2019). Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. *PLoS Pathog.* 15: e1008029
19. Dobrindt U (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 357-371
20. Schultz M (2008). Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14: 1012-1018
21. Grozdanov L *et al.* (2004). Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 186: 5432-5441
22. Cougnoux A *et al.* (2014). Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63: 1932–1942
23. Pleguezuelos-Manzano C *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8> (bezoekt: 27 februari 2020)
24. Nougayrede JP *et al.* (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313: 848-851

25. Hayashi T (2006). Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science* 313: 772-773
26. Olier M *et al.* (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes*, 3: 501-509
27. Arthur JC *et al.* (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 338: 120–123
28. Hafez M *et al.* (2009). The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in mediating interactions with intestinal epithelial cells and chemokine induction. *Infect. Immun.* 77: 2995–3003
29. Blum G *et al.* (1995). Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* 23: 234-236
30. Hughes C *et al.* (1982). Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin and antibiotic resistance determinants. *Infect. Immun.* 35: 270-275
31. Vassiliadis G *et al.* (2010). Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 288-297
32. Gronbach K *et al.* (2010). Safety of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 depends on intestinal microbiota and adaptive immunity of the host. *Infect. Immun.* 78: 3036-3046
33. Guenther K *et al.* (2010). Sever sepsis after probiotic treatment with *Escherichia coli* Nissle 1917. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29: 188-189
34. Krammer HJ *et al.* (2006). Probiotische Arzneimitteltherapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3807 Patienten [Probiotic drug therapy with *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN): results of a prospective study of the records of 3807 patients]. *Z. Gastroenterol.* 44: 651–656
35. Henker J *et al.* (2007). The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* 166: 311-318
36. Lodinová-Zádníková R & Sonnenborn U (1997). Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol. Neonate.* 71: 224-232
37. Jonkers D *et al.* (2012). Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* 72: 803-823
38. Kruis W (2004). Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 4:75-78
39. Kruis W *et al.* (2012). A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int. J. Colorectal Dis.* 27: 467-474
40. Losurdo G *et al.* (2015). *Escherichia coli* Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 24: 499-505
41. Scaldaferri F *et al.* (2016). Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. *World J. Gastroenterol.* 22: 5505-5511
42. Kruis W *et al.* (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut.* 53: 1617-1623

43. Wassenaar TM (2016). Insights from 100 years of research with probiotic *E. Coli*. Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp). 6: 147-161
44. von Buenau R *et al.* (2005). *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. J. Dairy Sci. 88: 317-323
45. Schroeder B *et al.* (2006). Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection. Dig. Dis. Sci. 51: 724-731
46. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie *Escherichia coli*. COGEM advies CGM/170828-01
47. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
48. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS). Organismen-Datenbank. <https://zag.bvl.bund.de/organismen/detail.jsf?dswid=7089&dssid=180&id=840> (bezoekt: 24 februari 2020)