

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 december 2021
KENMERK CGM/211228-03
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Klebsiella pneumoniae* CSUB10R

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld '*Klebsiella pneumoniae* CSUB10R' (IG 21-190_2.13-000), ingediend door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de *Klebsiella pneumoniae* stam CSUB10R. Deze bacteriestam is geïsoleerd uit een patiënt tijdens een uitbraak van een antibioticumresistente bacterie in een ziekenhuis. Ook is gevraagd of *K. pneumoniae* CSUB10R tot één van de drie *K. pneumoniae* subspecies (subsp. *ozaenae*, subsp. *pneumoniae* en subsp. *rhinoscleromatis*) behoort, en of de gehele bacteriesoort *K. pneumoniae* als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 op bijlage 4 van de Regeling ggo kan worden opgenomen.

K. pneumoniae stam CSUB10R bezit diverse eigenschappen waardoor deze bacterie resistent is tegen verschillende soorten antibiotica. Op basis van de beschikbare informatie adviseert de COGEM deze *K. pneumoniae* stam CSUB10R in te delen in pathogeniteitsklasse 2. De vraag of deze stam tot een van de genoemde *K. pneumoniae* subspecies behoort, kan de COGEM niet bevestigend beantwoorden zonder aanvullend genetisch onderzoek.

De COGEM bevestigt dat de soort *K. pneumoniae* beschouwd kan worden als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2. De COGEM kan daarom instemmen met opname van de soort *K. pneumoniae* in bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo, zonder onderverdeling in subspecies.



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. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van *Klebsiella pneumoniae* stam CSUB10R

COGEM advies CGM/211228-03

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van een vergunningaanvraag van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (IG 21-190) gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de *Klebsiella pneumoniae* stam CSUB10R. Tevens is gevraagd of *K. pneumoniae* CSUB10R tot één van de drie benoemde subspecies (subsp. *ozaenae*, subsp. *pneumoniae* en subsp. *rhinoscleromatis*) behoort en of de gehele soort *K. pneumoniae* als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 op bijlage 4 van de Regeling ggo kan worden opgenomen.¹

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae is een Gram-negatieve bacteriesoort behorende tot de familie *Enterobacteriaceae*, en is voor het eerst beschreven in 1882 als veroorzaker van longontsteking.² *K. pneumoniae* komt voor in verschillende ecologische niches als water en de bodem en in verschillende organismen, zoals planten, insecten en zoogdieren.^{3,4} De bacteriën kunnen als commensaal, als opportunistisch pathogeen en als pathogeen optreden.⁵ Geschat wordt dat *K. pneumoniae* het gastro-intestinaal stelsel van 4-6% van de mensen uit Westerse landen gekoloniseerd heeft en dat dit percentage stijgt tot ongeveer 25% onder personen die recentelijk met de gezondheidszorg te maken hebben gehad.^{6,7,8} Transmissie van *K. pneumoniae* vindt plaats door contact met besmette oppervlakten zoals gecontamineerde handen, werkkleding of medische hulpmiddelen. De bacteriesoort verspreidt zich niet via de lucht.⁹ Ook zijn infecties van *K. pneumoniae* bij dieren beschreven, waaronder in zeeleeuwen, buffels, koeien, apen en paarden.¹⁰

Het grootste gedeelte van de infecties die door *K. pneumoniae* worden veroorzaakt, zijn opportunistische ziekenhuisinfecties en deze leiden meestal tot longontstekingen, urineweginfecties en wondinfecties, maar kunnen ook leiden tot sepsis.^{4,11} *K. pneumoniae* infecties vormen voornamelijk problemen voor neonaten, ouderen, immuungecompromitteerden en patiënten waarbij medische hulpmiddelen in het lichaam zijn gebracht.^{3,4} Ziekte veroorzaakt door *K. pneumoniae* treedt in toenemende mate ook op buiten het ziekenhuis, zogenaamde 'Community Acquired Infections' (CAI), waarbij diabetes en alcoholisme als risicofactoren gezien worden.^{4,10,12,13,14}

K. pneumoniae is één van de zogenaamde 'ESKAPE' pathogenen, zes (hyper)virulente bacteriesoorten die zeer resistent kunnen zijn tegen antibiotica en veel ernstige ziekenhuisinfecties veroorzaken, die gedefinieerd zijn door de 'Infectious Diseases Society of America' (IDSA). De bacteriesoort is een reservoir voor verschillende antibioticumresistentiegenen en vormt een toenemend probleem in de gezondheidszorg vanwege zijn 'multidrug resistance' (MDR) tegen meerdere klassen antibiotica, vooral bètalactamantibiotica, fluoroquinolonen en aminoglycosiden.⁵ Behandeling van *K. pneumoniae* infecties kan hierdoor lastig zijn. De mortaliteit van ziekenhuisinfecties veroorzaakt door *K. pneumoniae* wordt geschat op 21% voor stammen die gevoelig zijn voor carbapenems (een groep antibiotica), en 42% voor de stammen die resistent tegen deze antibiotica zijn.¹⁵

Antibioticumresistentie in *K. pneumoniae* kan op verschillende manieren veroorzaakt worden, waaronder veranderen in de permeabiliteit van het (buiten)membraan, bijvoorbeeld door mutaties in zogenaamde porines. Porines zijn 'outer membrane proteins' (OMPs) die het buitenmembraan permeabel maken waardoor kleine moleculen, waaronder antibiotica, door specifieke diffusie in de cel terechtkomen.¹⁶ Mutaties in deze porines kunnen ervoor zorgen dat de bacterie resistent(er) wordt tegen antibiotica. De twee belangrijkste porines in *K. pneumoniae* betreffen OmpK35 en OmpK36.¹⁷

3.1 *Subspecies van K. pneumoniae*

Uit genomanalyses blijkt dat *K. pneumoniae* divers is. Met behulp van ‘whole-genome sequencing’ (WGS) zijn sommige klinische isolaten als verwante soorten geïdentificeerd, die 95-96% sequentieovereenkomst hebben met *K. pneumoniae* en 90% overeenkomst met andere Klebsiella-soorten. Deze soorten hebben geen formele taxonomische aanduiding, en worden soms ook wel als *K. pneumoniae* species complex (KpSC) aangeduid.⁴ De ‘List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature’ (LPSN), dat maandelijks nieuwe informatie verschaft over gevalideerde en gepubliceerde bacterienamen (i.e., wanneer deze gepubliceerd zijn in het ‘International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology’ (IJSEM) or in de ‘Approved List of Bacterial Names’), erkent 3 subspecies van *K. pneumoniae*: subsp. *pneumoniae*, subsp. *ozaenae*, en subsp. *rhinoscleromatis*.¹⁸ *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* kan ozaena of ‘stinkneus’ (atrofische rinitis) veroorzaken, een chronische infectie van het neusslijmvlies waarbij het slijmvlies dunner wordt en in een vergevorderd stadium ook het onderliggende bot kan worden aangetast.^{19,20} *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* kan rhinoscleroom veroorzaken, een chronische granulomateuze aandoening van de neus en de bovenste luchtwegen.^{20,21} In een zeldzaam geval is deze soort in verband gebracht met pneumonie en sepsis.²² *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* is endemisch in ontwikkelingslanden in (sub)tropische gebieden waar slechte hygiëne heerst.²¹ Er wordt in de wetenschappelijke literatuur echter ook twijfel geuit of deze subspecies wel als subspecies gezien dienen te worden, of eerder als virulente kloon afgeleid van *K. pneumoniae*.²³

3.2 *K. pneumoniae* stam CSUB10R

De *K. pneumoniae* stam CSUB10R is voor het eerst geïsoleerd uit een patiënt tijdens een ziekenhuisuitbraak van antibioticumresistente *K. pneumoniae* in de periode van mei 1993 tot juni 1995.^{16,24} Deze stam wordt gekenmerkt als een ‘extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producerende *K. pneumoniae* (ESBLKP). ESBL’s zijn enzymen die bepaalde soorten antibiotica (b β talactamantibiotica) kunnen hydrolyseren, waardoor deze niet meer effectief zijn.²⁵ Uit dezelfde patiënt is ook een antibioticagevoelige stam geïsoleerd, CSUB10S genoemd. Naast de productie van β -lactamase kan de multi-antibioticaresistentie ook gedeeltelijk worden verklaard door het ontbreken van de porines OmpK35 en OmpK36 in deze stam.^{26,27} Andere mechanismen voor antibioticaresistentie in CSUB10R betreffen een mutatie in het *gyrA* gen en een actieve efflux, het mechanisme waarmee (schadelijke) moleculen uit de bacterie gepompt kunnen worden.^{16,28}

K. pneumoniae stammen waarin de OmpK35 en OmpK36 porines ontbreken, zijn minder goed in staat te groeien en zijn minder virulent in een muismodel in vergelijking met een stam die deze porines wel tot expressie brengt.²⁹ In een andere studie is echter geen effect van het ontbreken van OmpK 35 of OmpK36 op de groei van CSUB10R waargenomen. In deze studie werd het effect van het ontbreken van beide porines op ‘outer membrane vesicles’ (OMVs) onderzocht: OMVs zijn blaasjes die de bacterie uitscheidt als gevolg van stress en bevatten verschillende componenten die kunnen bijdragen aan de bacteriële infectie van de gastheer. Door het ontbreken van OmpK35 en OmpK36 is de eiwitcompositie van de OMVs anders en werd in macrofagen een minder goede afweerreactie waargenomen.³⁰

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft op basis van een onderzoeksrapport uit 2011³¹ *K. pneumoniae* als soort ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³² In de actualisatie van de lijst met pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriesoorten in 2018 zijn hierbij de erkende subspecies *ozaenae*, *pneumoniae* en *rhinoscleromatis* opgenomen, maar is in het advies aangegeven dat de pathogeniteitsklasse van de species leidend is, tenzij de subspecies apart in de lijst zijn opgenomen. Laatstgenoemde is voor de subspecies van *K. pneumoniae* niet het geval.³³

5. Overweging en advies

K. pneumoniae is een bacteriesoort die wereldwijd verspreid voorkomt en vooral in ziekenhuizen infecties veroorzaakt bij patiënten die invasieve medische ingrepen hebben ondergaan of een verzwakt immuunsysteem hebben. De bacteriesoort vormt een toenemend probleem in de gezondheidszorg vanwege de resistentie tegen meerdere klassen antibiotica, waardoor behandeling lastig kan zijn. Er kunnen ook buiten het ziekenhuis infecties met *K. pneumoniae* optreden.

In Bijlage 4 van de Regeling ggo³⁴ worden van *K. pneumoniae* enkel de pathogeniteitsklassen van de drie *K. pneumoniae* subspecies vermeld, deze zijn alle ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM merkt op dat zij in haar adviezen *K. pneumoniae* sinds 2011 als species heeft geclassificeerd als pathogene bacterie in pathogeniteitsklasse 2.³² In haar actualisatie van de overzichtslijst met (a)pathogene bacteriën uit 2018 heeft zij opgemerkt dat de species onderverdeeld is in drie subspecies, maar is tevens vermeld dat de pathogeniteitsklasse van de soort leidend is. Hierbij bevestigt de COGEM dat zij *K. pneumoniae* beschouwt als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM is gevraagd of *K. pneumoniae* stam CSUB10R tot één van de subspecies *pneumoniae*, *ozaenae* of *rhinoscleromatis* behoort. Dit is voor zover bij de COGEM bekend niet in de wetenschappelijke literatuur beschreven. De COGEM acht het waarschijnlijk dat de stam CSUB10R tot de subspecies *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* behoort, aangezien *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* gemakkelijk geïdentificeerd kan worden met een PCR-test gebaseerd op het specifieke kapseltype (K3) en een SNP in het fosfaat-porine gen *phoE*,³⁵ en *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* heel zelden als invasieve bacterie wordt gerapporteerd en vooral is geassocieerd met een chronische atrofische rhinitis. Hierbij dient echter opgemerkt te worden dat voor een bevestigend antwoord op deze vraag verder genetisch onderzoek (met gerichte PCR of WGS) uitgevoerd dient te worden.

K. pneumoniae stam CSUB10R is geïsoleerd uit een patiënt gedurende een uitbraak van ESBL-*K. pneumoniae* in het ziekenhuis. Deze ESBL-producerende stam bezit meerdere mechanismen waardoor deze resistent is tegen verschillende soorten antibiotica. Een van de mechanismen betreft het ontbreken van de porines OmpK35 en OmpK36. Het meeste onderzoek met CSUB10R vindt plaats in het kader van antibioticumresistentie. Onderzoek naar virulentie en pathogeniteit van CSUB10R is schaars en onderzoek naar de effecten van het ontbreken van met name porine OmpK36 in verschillende *K. pneumoniae* stammen op de virulentie geven niet altijd een eenduidig beeld.³⁰ Op basis van de beschikbare informatie ziet de COGEM geen redenen om deze stam anders te classificeren dan de soort

K. pneumoniae, en adviseert zij deze *K. pneumoniae* stam CSUB10R te classificeren als organisme van pathogeniteitsklasse 2.

Concluderend adviseert de COGEM *K. pneumoniae* stam CSUB10R in te delen in pathogeniteitsklasse 2, eender aan de pathogeniteitsklasse zoals zij die voor de species *K. pneumoniae* heeft geadviseerd. De COGEM kan instemmen met opname van de species *K. pneumoniae* in bijlage 4, lijst 4.2 van de Regeling ggo, zonder onderverdeling in subspecies.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht op 20 december 2021)
2. Friedlander C (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. Arhiv. F. Pathol. Anat. 87: 319-24
3. Bengoechea JA, Sa Pessoa J (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiol. Rev. 43: 123-144
4. Wyres KL *et al.* (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat. Rev. Microbiol. 18: 344-359
5. Bengoechea JA, Sa Pessoa J (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiol. Rev. 43: 123-144
6. Gorrie CL *et al.* (2017). Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *K. pneumoniae* infection in intensive care patients. Clin. Infect. Dis. 65: 208-215
7. Martin RM *et al.* (2016). Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere 1: e00261-e00316
8. Ludden C *et al.* (2020). A One Health study of the genetic relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and their mobile elements in the East of England. Clin. Infect. Dis. 70: 219-226
9. Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Richtlijn: BRMO. Bijzonder resistente micro-organismen (BRMO), in het bijzonder carbapenemaseproducerende Enterobacteriaceae (CPE). <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/brmo> (bezocht: 21 december 2021)
10. Russo TA & Marr CM (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin. Microbiol. Rev. 32: e00001-19
11. Paczosa MK, Meccas J (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80: 629-661
12. Ko WC *et al.* (2002). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg. Infect. Dis. 8: 160-166
13. Kim JK *et al.* (2009). Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumoniae*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28: 109-111
14. Ko WC *et al.* (2002). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg. Infect. Dis. 8: 160-166
15. Xu *et al.* (2017). Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 16: 18

16. Ardanuy C *et al.* (1998). Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *AAC* 42: 1636-1640
17. Sugawara E *et al.* (2016). *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. *J. Bacteriol.* 198: 3200-3208
18. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Search: *Klebsiella pneumoniae* <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Klebsiella+pneumoniae> (bezoekt: 22 december 2021)
19. Renois F *et al.* (2011). Preliminary investigation of a mice model of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* induced pneumonia. *Microbes Infect.* 13: 1045-1051
20. Botelho-Nevers E *et al.* (2007). Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 11: 423-429
21. Corelli B (2018). Rhinoscleroma pathogenesis: The type K3 capsule of *Klebsiella rhinoscleromatis* is a virulence factor not involved in Mikulicz cells formation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12: e0006201.
22. Kumade E (2016). A case of lobar pneumonia and sepsis with death caused by invasive *Klebsiella rhinoscleromatis* infection. *J. Infect. Chemother.* 22: 707-711
23. Brisse S *et al.* (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 4: e4982.
24. Peña C *et al.* (1998). Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *AAC* 42: 53-58
25. Ghafourian S *et al.* (2015). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 17: 11-21
26. Doménech-Sánchez A *et al.* (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *AAC* 47: 3332-3335
27. Martínez-Martínez L. (2008). Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect* 14: 82-89
28. Doménech-Sánchez A *et al.* (2006). Evaluation of differential gene expression in susceptible and resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by DNA microarray analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 936-940
29. Tsai Yu-Kuo *et al.* (2011). *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *AAC* 55: 1485-1493
30. Turner KL *et al.* (2016). Porin loss impacts the host inflammatory response to outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60: 1360–1369
31. COGEM (2011). Classification of bacterial pathogens. COGEM onderzoeksrapport CGM/2011-07
32. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
33. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
34. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 4. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-10-01#Bijlage4> (Bezoekt: 23 december 2021)
35. Fevre C *et al.* (2011). PCR-Based Identification of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, the Agent of Rhinoscleroma. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1052