

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. V.L.W.A. Heijnen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 02 augustus 2022  
**KENMERK** CGM/220802-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie en werkzaamheden *S. enterica*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een 2.8 verzoek van Intervet International B.V. over werkzaamheden met verschillende *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovars (IG 22-083\_2.8-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van 24 serovars van *Salmonella enterica* die nog niet in de Regeling ggo zijn opgenomen. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze *Salmonella* serovars.


De serovars Typhi en Paratyphi zijn tyfoïde salmonellavarianten die de ziekten buiktyfus en paratyfus veroorzaken. Alle andere *Salmonella* serovars zijn zogeheten 'niet-tyfoïde' salmonellavarianten die vaak leiden tot zelflimiterende ontsteking van het maag-darmkanaal. Alle niet-tyfoïde salmonellavarianten zijn in staat om zich te ontwikkelen tot een ernstigere invasieve infectie waar behandeling voor noodzakelijk is. De COGEM adviseert om de 24 *Salmonella* serovars in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

In de onderhavige aanvraag wenst de aanvrager de *Salmonella* serovars genetisch te modificeren en te gebruiken om kippen te vaccineren, teneinde de bescherming tegen reguliere salmonella te onderzoeken.

Onder inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde maatregelen en inperkingsniveaus, en de door de COGEM voorgestelde aanvullende maatregel, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

***Met het oog op eventuele belangenverstrengeling, is COGEM lid dr. ir. G.P. Pijlman niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies***

# Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden voor 24 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars

## COGEM advies CGM/220802-01

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Intervet International B.V. (IG 22-083) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse (Appendix I) van 24 verschillende, nog niet in de Regeling ggo<sup>1</sup> opgenomen, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (vanaf nu beschreven als '*Salmonella enterica*') serovars. Daarbij is de COGEM gevraagd of *S. enterica* serovar Java taxonomisch onder serovar Paratyphi B valt. Tevens is de COGEM gevraagd om te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) mutanten van deze serovars op inperkingsniveau ML-II, DM-II en/of DM-III. De werkzaamheden betreffen het genereren van gg-*S. enterica* mutanten, en het gebruik van deze gg-*S. enterica* mutanten om kippen te vaccineren, waarbij de kippen na het vaccineren kunnen worden 'gechallenged' met wildtype heterologe of homologe *S. enterica* isolaten.

### 2. *Salmonella enterica*

Het bacteriegenus *Salmonella* behoort tot de familie *Enterobacteriaceae*.<sup>2</sup> *Enterobacteriaceae* zijn gramnegatieve, facultatief anaerobe staafvormige bacteriën. Veel *Enterobacteriaceae* komen voor in het maag-darmkanaal van warmbloedige dieren. De meesten zijn commensalen die deel uitmaken van de normale darmflora.<sup>3</sup> Verschillende stammen bezitten daarnaast ook extrachromosomaal DNA in de vorm van plasmiden. Deze plasmiden bevatten veelal genen die betrokken zijn bij virulentie en antibioticaresistentie.<sup>3</sup>

Op basis van DNA-homologie is het genus *Salmonella* in twee soorten onderverdeeld, *Salmonella enterica* en *Salmonella bongori*. De soort *S. enterica* is verder onderverdeeld in zes ondersoorten.<sup>2</sup> Door de grote antigene verscheidenheid onder de subspecies van *S. enterica* zijn verschillende serovars (serotypen) aan deze subspecies toegewezen.<sup>3</sup> In de wetenschappelijke literatuur worden de namen van deze serovars vaak afgekort: *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi wordt ook wel aangeduid als *Salmonella* ser. Typhi of *Salmonella* Typhi.

#### 2.1 Pathogeniteit *Salmonella enterica*

*S. enterica* subsp. *enterica* wordt voornamelijk in zoogdieren aangetroffen en is verantwoordelijk voor ongeveer 99% van de salmonella-infecties bij mensen en warmbloedige dieren.<sup>4</sup> De andere 5 subspecies van *Salmonella enterica* zijn zeldzaam in mensen.

Besmetting met *Salmonella* treedt meestal op wanneer de bacterie het verteringsstelsel binnentreedt na het binnenkrijgen van met *Salmonella* besmet water of (rauwe) voedselproducten. Transmissie kan ook plaatsvinden door direct contact met besmette mensen, dieren of gecontamineerde oppervlakten (fomieten). Na besmetting induceert de bacterie zijn eigen fagocytose om de gastheercel binnen te treden en daar te persisteren.<sup>4</sup>

Op basis van de klinische symptomen van een salmonella-infectie, kunnen *Salmonella*-stammen worden gegroepeerd in typhoïde *Salmonella* (*S. enterica* var. Typhi welke buiktyfus veroorzaakt<sup>5</sup> en *S. enterica*

var. Paratyphi A, B en C<sup>6</sup> welke paratyfus veroorzaken) en non-typhoïde Salmonella (NTS). De typhoïde Salmonella serovars Typhi en Paratyphi komen uitsluitend voor in mensen en hebben geen dierlijk reservoir.<sup>4</sup> Typhoïde salmonella-infecties zijn zeldzaam in Nederland, en kunnen leiden tot de meldingsplichtige ziekten buiktyfus of paratyfus ('enteric fever') wat in het begin gepaard gaat met koorts, buikpijn, diarree of constipatie. Buiktyfus (Typhi) kent over het algemeen een ernstiger beloop met een mortaliteit van 10-25% wanneer de infectie onbehandeld blijft.<sup>5</sup> Hoewel het ziektebeeld van paratyfus (Paratyphi) in bepaalde opzichten op buiktyfus lijkt, kan het beloop van paratyfus ook mild of asymptomatisch plaatsvinden.<sup>6</sup>

## 2.2 Non-typhoïde Salmonella (NTS)

Non-typhoïde *Salmonella* (NTS) serovars veroorzaken jaarlijks wereldwijd ongeveer 153 miljoen infecties in mensen.<sup>7</sup> Infecties met NTS resulteren voornamelijk in gastro-enteritis en zijn grotendeels zelflimiterend, maar kunnen levensbedreigend zijn als de infectie invasief wordt.<sup>8</sup> Ongeveer 5% van de humane patiënten met een NTS infectie ontwikkelt bacteriëmie, wat in ongeveer 15% van de gevallen een dodelijke afloop heeft.<sup>8,9</sup> De kans op een invasief beloop en/of de ernst van de NTS infectie en de mortaliteit van een invasieve infectie, verschilt per *Salmonella* serovar, land en regio, en is afhankelijk van de gezondheid van de gastheer.<sup>8,10</sup> Kinderen, ouderen en mensen met een verminderde immuunrespons hebben een grotere kans op een ernstiger beloop van de infectie.<sup>4</sup> Met name *S. enterica* var. Dublin en *S. enterica* var. Choleraesuis zijn sterk geassocieerd met de ontwikkeling van bacteriëmie en een invasieve infectie.<sup>11</sup> De bacterie kan behandeld worden met antibiotica, waarbij de toenemende antibioticumresistentie van de bacterie echter een steeds groter probleem vormt.

Hoewel er een zeer groot aantal serovars zijn beschreven voor *S. enterica* (meer dan 2600), wordt slechts een klein deel ervan regelmatig uit mensen geïsoleerd.<sup>12</sup> De gastheerspecifieke serovars *S. Gallinarum*<sup>13</sup> (en *S. Pullorum*), *S. Abortusovis*<sup>14</sup> en *S. Choleraesuis*<sup>15</sup> hebben één of enkele gastheren, en veroorzaken voornamelijk salmonellose met tyfus-achtige ziekte in respectievelijk pluimvee, schapen en zwijnen. *S. Dublin* is een serovar dat frequent ziekte veroorzaakt in (jonge) runderen, wat kan leiden tot enteritis of systemische ziekte, of abortus in zwangere runderen.<sup>16</sup> *S. Dublin* veroorzaakt echter ook regelmatig ziekte in mensen. In tegenstelling tot de gastheerspecifieke serovars, hebben onder andere de serovars Enteritidis en Typhimurium een breed gastheerbereik.<sup>17</sup>

In Nederland zijn in 2021 de serovars Enteritidis (25%) en Typhimurium (19%) het vaakst aangetroffen in mensen met een klinische salmonella-infectie (salmonellose).<sup>18</sup> In varkens werden de serovars Typhimurium (32%) en Derby (27%) het meest frequent aangetroffen, in rundvee de serovars Dublin (42%) en Typhimurium (27%), in vleeskuikens de serovars Infantis (35%) en Paratyphi B var. Java (19%) en in legkippen de serovars Enteritidis (59%) en Typhimurium (15%).<sup>18</sup>

## 3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *S. enterica* Typhi (*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>19</sup> De vaccinstam *S. Typhi* Ty21a is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>20</sup> Alle andere door de COGEM geclassificeerde *Salmonella* (sub)species zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 (*S. bongori*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *enterica* en subsp. *enterica* serovars

Abortusequi, Abortusovis, Gallinarum, Infantis, Paratyphi, Poona, Pullorum, Typhimurium en Typhimurium stam TA15).<sup>19</sup>

#### **4. Voorgenomen werkzaamheden en voorstel tot inschaling**

In onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens verschillende *S. enterica* serovars genetisch te modificeren. Deze gg-*Salmonella* mutanten worden gebruikt om kippen te vaccineren, die na de vaccinatie mogelijk 'gechallenged' zullen worden met heterologe of homologe wildtype *S. enterica* isolaten.

##### **4.1 Het genereren van de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* mutanten**

De aanvrager wenst de volgende 24 (nog niet in de Regeling ggo<sup>1</sup> opgenomen) *S. enterica* subsp. *enterica* serovars genetisch te modificeren:

- Dublin
- Virchow
- Heidelberg
- Java (ook wel Paratyphi B var. Java)
- Newport
- Montevideo
- Bovismorbificans
- Hadar
- Agona
- Senftenberg
- Livingstone
- Kentucky
- Anatum
- Ohio
- Kedougou
- Muenster
- Reading
- Mbandaka
- Kottbus
- Kibusi
- Orion
- Weltevreden
- Godesberg
- Thompson

De aanvrager is voornemens om deze 24 *S. enterica* subsp. *enterica* serovars te attenueren door (combinaties van) deleties aan te brengen in de genen *aroA*, *aroC*, *recA*, *cra*, *leuX* en *htrA*, in combinatie met additionele deleties in één of meerdere 'flagellar system subunit' genen, gastheercolonisatiefactoren

en genen betrokken bij metabolisme. In deze mutanten worden vervolgens de non-toxische subunit van de *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB)<sup>21</sup>, marker- en reporter genen ('fluorescent', 'chemiluminescent' of enzymatisch) geïnsereerd.

De methode die de aanvrager voornemens is te gebruiken om de mutanten te generen, is beschreven in Datsenko *et al.*<sup>22</sup> Bij deze methode worden plasmides met een antibioticumresistentie cassette/merker, geflankeerd door flippase recognition target (FRT) sequenties, als template gebruikt om een PCR-product te genereren met 5' en 3' 'overhangs' die homolog zijn aan de flankerende sequenties van het gen dat verwijderd dient te worden. Door twee temperatuur-sensitieve helperplasmiden in de bacterie te transformeren, kunnen een recombinase en een induceerbaar flippase enzym *in trans* worden aangeboden. Expressie van het recombinase zorgt dat het gen dat verwijderd dient te worden, wordt vervangen door de resistentiecassette. Door vervolgens het flippase enzym tot expressie te brengen, wordt deze antibioticumresistentie cassette/merker door het flippase systeem verwijderd, waardoor het gewenste gen en de resistentiemarker zijn verwijderd en er alleen een FRT sequentie achterblijft. De aanvrager geeft aan dat de kanamycine- en chloramphenicolmarkers worden verwijderd, alvorens de mutanten in dierstudies worden gebruikt.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-II.

#### **4.2 Vaccinatie van kippen (*Gallus domesticus*) met de gg-Salmonella stammen**

De aanvrager is voornemens de bovenstaande gegenereerde mutanten te gebruiken om kippen te vaccineren. Na het vaccineren van de kippen worden de kippen eventueel 'gechallenged' met wildtype heterologe of homologe *Salmonella*.

De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op zowel inperkingsniveau DM-II als DM-III.

Voor de werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II worden de standaard voorschriften gehanteerd, waarbij de aanvrager de volgende aanvullende maatregel voorstelt:

- De huisvesting van en alle handelingen met de dieren vinden plaats in een onderdrukisolator die voorzien is van een HEPA-filter, dat gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd;

Voor de werkzaamheden op inperkingsniveau DM-III worden de standaard inrichtingsvoorschriften en werkinstructies gevolgd, waarbij de aanvrager de volgende aanvullende maatregelen voorstelt:

- Na het vaccineren van de kippen in de DM-III ruimte, worden de kippen direct in afgesloten accommodatie-eenheden geplaatst;
- De 'challenges' met wildtype *Salmonella* worden in dezelfde afgesloten accommodaties op DM-III uitgevoerd;

- Medewerkers dragen beschermende kleding (handschoenen, wegwerpkleding, haarnetten, veiligheidsbrillen, FFP3 mondmakers of aangedreven respiratoire bescherming) wanneer vaccins door middel van een spray worden toegediend en overschoenen;

De aanvrager wenst werkzaamheden met de monsters verkregen uit de dierexperimenten op DM-II en DM-III niveau, uit te voeren op inperkingsniveau ML-II.

## 5. Overweging

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de 24 *S. enterica* serovar die de aanvrager voornemens is genetisch te modificeren. Tevens is de COGEM gevraagd welke inperkingsmaatregelen er noodzakelijk zijn voor de vaccinatie- en 'challenge' werkzaamheden van kippen met deze gg-*Salmonella* stammen.

### 5.1 Pathogeniteitsclassificatie van de 24 *Salmonella enterica* serovars

De 24, nog niet in de Regeling ggo opgenomen<sup>1</sup>, NTS serovars die de aanvrager voornemens is genetisch te modificeren, zijn alle geassocieerd met ziekte in mensen en/of dieren, en dikwijls afkomstig van dieren, of gecontamineerde dierlijke (voedsel)producten.<sup>8,23</sup> Er bestaan tussen deze serovars verschillen in invasiviteit en de hoeveelheid NTS infecties die worden veroorzaakt.<sup>8,10</sup>

Serovar Java wordt ook wel aangeduid als *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B variant Java (Paratyphi B var. Java). De COGEM is gevraagd of serovar Java taxonomisch onder serovar Paratyphi kan worden ingedeeld. De tyfoïde 'D-tartrate non-fermenting' serovar Paratyphi B *sensu stricto* veroorzaakt paratyfus in mensen. Paratyphi B var. Java is een D-tartraat fermenterend isolaat die in mensen echter minder virulent is en gastro-enteritis veroorzaakt in plaats van paratyfus.<sup>24</sup>

Infecties met NTS ontwikkelen zich in ca. 5% van de gevallen tot een invasieve infectie waarvoor behandeling noodzakelijk is en ongeveer 15% tot de dood leidt.<sup>8</sup> De meeste NTS infecties verlopen echter zelflimiterend. De kans op een invasieve infectie, en de ernst van de infectie is groter in jonge kinderen, ouderen, mensen met een verminderende immuunrespons.<sup>4,8</sup>

Al het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM de 24, in dit advies genoemde en nog niet in de Regeling ggo<sup>1</sup> opgenomen, serovars in te delen in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM adviseert tevens serovar Paratyphi B var. Java (serovar Java) op te nemen als aparte variant van Paratyphi B.

### 5.2 Inschaling van de voorgestelde werkzaamheden

De aanvrager geeft aan gg-*Salmonella* mutanten te genereren waar deleties in de genen *aroA*, *aroC*, *recA*, *cra*, *leuX* en *htrA* zijn aangebracht, in combinatie met additionele deleties in één of meerdere 'flagellar system subunit' genen, gastheercolonisatiefactoren en genen betrokken bij metabolisme. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat deleties en/of disrupties in deze genen of 'pathways' leiden tot attenuatie in de onderzochte *S. enterica* stammen.<sup>25,26,27,28,29</sup>

### **5.2.1 Inschaling werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II**

De aanvrager verzoekt de mutanten te generen op inperkingsniveau ML-II. Monsters verkregen van met de gg-*Salmonella* en/of wildtype *Salmonella* gevaccineerde of 'gechallengde' dieren op DM-II en DM-III niveau, zullen gedesinfecteerd worden (zie **sectie 4** in dit advies). De monsters zullen vervolgens worden gehanteerd op inperkingsniveau ML-II.

Alle *Salmonella enterica* serovars die genetisch gemodificeerd dienen te worden, zijn in het verleden door de COGEM<sup>19</sup>, en in dit advies, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De kans dat de mutaties die in de gg-*Salmonella* stammen worden aangebracht tot een hogere pathogeniteit leiden, acht de COGEM verwaarloosbaar klein.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij werkzaamheden met de gg-*Salmonella* stammen, of met monsters verkregen van met wildtype of gg-*Salmonella* besmette kippen op inperkingsniveau ML-II, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### **5.2.2 Inschaling van werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II en DM-III**

Pluimvee is vatbaar voor een groot aantal verschillende serovars, maar infectie van kippen ouder dan 3-4 dagen resulteert zelden in klinische ziekte (met uitzondering van de serovars Gallinarum/Pullorum en *S. enterica* subsp. *Arizonae*).<sup>13</sup> In pas uitgekomen kuikens veroorzaken NTS doorgaans ziekte, waarbij een combinatie van anorexia en uitdroging tot de dood kan leiden.<sup>13</sup>

Horizontale transmissie van de gg-*Salmonella* is mogelijk door direct contact tussen kippen, inname van gecontamineerd voedsel of feces, of via aerosolen en besmette stofdeeltjes.<sup>30</sup> Transmissie van *Salmonella* van mens-op-mens is uiterst zeldzaam, en zal tussen mensen voornamelijk plaatsvinden via de oraal-fecale route.

De aanvrager geeft aan dat de huisvesting en alle handelingen met de dieren op inperkingsniveau DM-II zullen plaatsvinden in onderdrukisolatoren die zijn voorzien van een HEPA-filter, die gelijktijdig met de isolator kan worden gedesinfecteerd.

Voor de voorgestelde werkzaamheden geeft de aanvrager aan dat de kippen in de DM-III ruimte worden gevaccineerd met de gg-*Salmonella* mutanten en/of 'gechallenged' met de wildtype *Salmonella* isolaten, en na het vaccineren in afgesloten accommodatie-eenheden worden geplaatst (zie **sectie 4**). Tevens geeft de aanvrager aan dat medewerkers beschermende kleding (handschoenen, wegwerpkleding, overschoenen, haarnetten, veiligheidsbrillen, FFP3 mondklappers of aangedreven respiratoire bescherming) zullen dragen wanneer vaccins door middel van een spray worden toegediend. Indien handelingen worden verricht buiten onderdrukisolatoren, - anders dan de vaccinatie via sprays waarvoor de aanvrager al passende maatregelen hanteert-, adviseert de COGEM om overschoenen en beschermende kleding inclusief een FFP3 mondneusmasker te dragen.

Al het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij het uit voeren van de voorgestelde werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II en/of DM-III, met inachtnaam van de door de



COGEM voorgestelde aanvullende maatregelen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## 6. Advies

De COGEM adviseert de 24 in de aanvraag genoemde en niet in de Regeling ggo<sup>1</sup> opgenomen *S. enterica* serovars in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De COGEM stemt in met de voorgenomen werkzaamheden met de gg-*Salmonella* stammen en de monsters verkregen van met wildtype of gg-*Salmonella* besmette kippen op inperkingsniveau ML-II.

Voor de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II en/of DM-III, adviseert de COGEM om naast de door de aanvrager voorgestelde maatregelen (zie **sectie 4** van dit advies) de volgende aanvullende maatregel in acht te nemen:

- Indien handelingen worden verricht buiten onderdrukisolatoren, - anders dan de vaccinatie via sprays waarvoor de aanvrager al passende maatregelen hanteert-, adviseert de COGEM om overschoenen en beschermende kleding inclusief een FFP3 mondneusmasker te dragen.

Onder inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde maatregelen en inperkingsniveaus, en de door de COGEM voorgestelde aanvullende maatregelen, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.  
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezocht op 25-07-2022)
2. Murray PR *et al.* (2002). *Enterobacteriaceae*. In: Medical Microbiology. Ed. Schmitt W & Grigg L, Mosby Inc., St Louis
3. Baker S & Dougan G (2007). The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. Clin Infect Dis 45: S29-33
4. Eng SK *et al.* (2015). *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Fron. Life Sci. 8: 284-293
5. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu – LCI richtlijnen buiktyfus [Buiktyfus | LCI richtlijnen \(rivm.nl\)](#) (bezocht: 20-07-22)
6. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu – LCI richtlijnen paratyfus [Paratyfus | LCI richtlijnen \(rivm.nl\)](#) (bezocht: 20-07-22)
7. Kirk MD *et al.* (2015). World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal and viral diseases, 2010: a data synthesis. PloS Med. 12:e1001921
8. Marchello CS *et al.* (2022). Complications and mortality of non-typhoidal salmonella invasive disease: a global systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. 22: 692-705

9. Ao TT *et al.* (2010). Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* diseases, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 941-949
10. Hu Y *et al.* (2022). Non-typhoidal salmonella invasive infections in China. *Lancet Infect. Dis.* 22: 939
11. Woods *et al.* (2008). Rapid multiplex PCR and real-time TaqMan PCR assays for detection of *Salmonella enterica* and the highly virulent serovars sCholeraesuis and Paratyphi C. *J. Clin. Microbiol.* 46: 4018-4022
12. Martinez-Sanguiné AY *et al.* (2021). *Salmonella enterica* serovars Dublin and Enteritidis comparative proteomics reveals differential expression of proteins involved in stress resistance, virulence, and anaerobic metabolism. *Infect. Imm.* 89: e00606-20
13. Shivaprasad HL *et al.* (2013). *Salmonella* infections in the domestic fowl. *Salmonella* in domestic animals 2<sup>nd</sup> edition, edited by Barrow PA & Methner U, CAB, Boston, ISBN-13: 978 1 84593 902 1
14. Amagliani G *et al.* (2021). *Salmonella* Abortusovis: an epidemiologically relevant pathogen. *Curr. Microbiol.* 79: 3
15. Gray JT *et al.* (1996). Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 141-146
16. Garcia-Soto S *et al.* (2021). Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin in german cattle herds using Whole-Genome Sequencing. *Microbiol. Spectr.* 31:e0033221
17. Foley SL *et al.* (2013). *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77: 582-607
18. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu & Stichting Werkgroep Antibioticabeleid (2022) . Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2021. *NethMap 2022*
19. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/211025-01
20. COGEM (2015). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met een op *Salmonella* Typhi gebaseerd vaccin. COGEM advies CGM/150716-01
21. Rappuoli R *et al.* (1999). Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 20: 493-500
22. Datsenko KA & Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97: 6640-6645
23. Ferrari RG *et al.* (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: e00591-19
24. Gand M *et al.* (2019). Development of a real-time PCR method for the genoserotyping of *Salmonella* Paratyphi B variant Java. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 4987-4996 (2019)
25. Hoiseth SK & Stocker BAD (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239
26. Chaudhuri RR (2013). Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PloS Genet.* 9: e1003456
27. Buchmeier NA *et al.* (1993). Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative bursts of macrophages. *Mol. Microbiol.* 7: 933-936
28. Yimga MT *et al.* (2006). Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 74: 1130-1140

29. Johnson K *et al.* (1991). The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence.. Mol. Microbiol. 5: 401-407
30. Gast RK *et al.* (2014). Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. Poultry Sci. 93: 3145-3151

### **Appendix I. Classificatie van micro-organismen volgens de Regeling 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.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst worden.

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.