

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

DATUM 13 februari 2024
KENMERK CGM/240213-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met gg-isolaten van de bacterie *E. coli*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 23-191_2.8-000 getiteld 'Antibioticum resistentiegenen in *E. coli* PG2 in ML-II en handelingen daarmee in ML-I', ingediend door de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

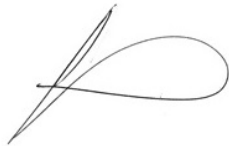
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) isolaten van de bacterie *Escherichia coli*. De aanvrager is voornemens om kandidaat-resistentiegenen te modificeren en vervolgens te introduceren en tot expressie te brengen in gg-*E. coli* isolaten en laboratoriumstammen.

De COGEM heeft wildtype *E. coli* in pathogeniteitsklasse 2 en de laboratoriumstammen B en K12 in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat de voorgestelde modificaties de virulentie of pathogeniteit van de gebruikte *E. coli* stammen verhogen. De COGEM acht het mogelijk dat bij de werkzaamheden *E. coli* met brede antibioticumresistentie kan ontstaan. Echter met inachtneming van de aanvullende voorschriften is de kans op verspreiding naar mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren. Tevens adviseert zij de door de aanvrager voorgestelde aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen, ten einde te voorkomen dat de gg-bacteriën in het milieu verspreid worden. Onder inachtneming van het genoemde inperkingsniveau en de aanvullende werkvoorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden 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

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde isolaten van de bacterie *Escherichia coli*

COGEM advies CGM/240213-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren (IG 23-191) over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Escherichia coli*. De aanvraag is afkomstig van de Wageningen Universiteit. De aanvrager is voornemens om kandidaat-resistentiegenen te modificeren en vervolgens te introduceren en tot expressie te brengen in *E.coli* isolaten en de laboratoriumstammen *E. coli* B en K12. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II. Hierbij worden een aantal aanvullende voorschriften gehanteerd. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit inschalingsvoorstel met inbegrip van de aanvullende voorschriften.

2. Achtergrondinformatie over *Escherichia coli*

E. coli bacteriën zijn Gram-negatieve staafvormige facultatief anaerobe bacteriën die behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae*.¹ *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.^{2,3,4} *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).⁵ Ook bestaan er varianten die specifiek ziekteverwekkend zijn voor vogels (aviaire pathogene *E. coli* of APEC),^{6,7} maar deze zijn niet in staat de mens te koloniseren.⁷

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.^{2,8,9} In het algemeen kunnen *E. coli* infecties met behulp van antibiotica goed worden bestreden, maar infecties met multiresistente varianten komen steeds vaker voor.^{10,11}

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).²

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om werkzaamheden uit te voeren met *E. coli* isolaten afkomstig uit gezonde humane/dierlijke (kip) feces. Er is vooraf vastgesteld dat het niet om shigatoxine-producerende isolaten gaat en de isolaten gevoelig zijn voor carbapenems. In dit onderzoek worden *E. coli* genen bestudeerd die mogelijk betrokken zijn bij antibioticumresistentie tegen derde-generatie cefalosporines. Naast het bèta-lactamase gen TEM-1, gaat het specifiek om het 'outermembrane protein' OmpF, genen die de

expressie en affiniteit van een zogenaamde ‘efflux pomp’ verhogen, het gen voor het PBP3 eiwit, en een gen betrokken bij de expressie van ‘outermembrane vesicles’.

De aanvrager is voornemens om experimenten uit te voeren waarbij door ‘site directed’ mutagenese antibioticumresistentie genen in wildtype, B en K12 *E. coli* stammen worden geïntroduceerd. Daarnaast zal onder druk van een enkel antibioticum de evolutie en verspreiding van antibioticumresistentie genen bestudeerd worden in de experimentele *E. coli* populaties. Vervolgens worden plasmiden voortkomend uit deze werkzaamheden overgebracht naar andere *E. coli* stammen en worden daarnaast ook genen uit *E. coli* die mogelijk bij antibioticumresistentie zijn betrokken in verschillende *E. coli* stammen tot expressie gebracht.

De aanvrager geeft aan dat bij de handelingen door mutaties, in de vorm van enkele aminozuur veranderingen, coderende sequenties voor ‘extended spectrum bèta lactamases’ (ESBLs) kunnen ontstaan. ESBLs zijn enzymen die resistentie bieden tegen de meeste bètalactam-antibiotica, waaronder penicillines, cefalosporines en de monobactam aztreonam. De aanvrager stelt een aantal aanvullende maatregelen voor om schadelijke effecten van ESBL bacteriën voor mens en milieu in te perken:

- Voor activiteiten met gg-micro-organismen die infectieus zijn via wondjes van de huid, die zich via gebruiksvoorwerpen (fomites) kunnen verspreiden en/of die zich oro-fecaal dan wel oraal kunnen verspreiden:
 - o Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
 - o Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

Daarnaast zal voordat met een bepaald *E. coli* isolaat zal worden gewerkt, eerst m.b.v. een M.I.C (‘Minimal Inhibitory Concentration’) assay worden getest of dit isolaat gevoelig is voor verschillende carbapenems.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *E. coli* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, m.u.v. de hemolytisch syndroom geassocieerde *E. coli* (HUSEC), die zij in klasse 3 heeft ingedeeld. Bepaalde geïntroduceerde *E. coli* laboratoriumstammen zijn ingedeeld in klasse 1, waaronder K12 en B.¹² De COGEM heeft in 2019 geadviseerd over werkzaamheden met gg-*E. coli* waarin sequenties waren ingebracht die o.a. coderen voor een kanamycine-resistentie en fragmenten van toxines.¹³ De COGEM was van oordeel dat de ingebrachte eigenschappen de pathogeniteit van gg-*E. coli* niet verhoogde en adviseerde de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren. Tevens adviseerde zij – conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen – enkele aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen, ten einde te voorkomen dat de gg-bacteriën in het milieu verspreid worden.

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met gg-*E. coli*. Tijdens de werkzaamheden worden antibioticumresistentiegenen in *E. coli* isolaten geïntegreerd, worden met deze stammen evolutie-experimenten uitgevoerd, en worden vervolgens plasmiden en/of genen die (na

mutatie of selectiedruk) mogelijk bij antibioticumresistentie betrokken zijn in andere (gg-) *E. coli* stammen tot expressie gebracht.

De gebruikte *E. coli* isolaten zijn afkomstig uit gezonde individuen, daarnaast is vastgesteld dat het hier niet gaat om shigatoxine-producerende isolaten en dat de isolaten gevoelig zijn voor carbapenems. De gebruikte *E. coli* isolaten zijn organismen van pathogeniteitsklasse 2 en de gebruikte laboratoriumstammen van pathogeniteitsklasse 1.

Bij de voorgestelde werkzaamheden kunnen door mutaties coderende sequenties voor ‘extended spectrum bèta lactamases’ (ESBLs) ontstaan.¹⁴ ESBLs zijn enzymen die resistentie bieden tegen de meeste bètalactam-antibiotica, waaronder penicillines, cefalosporines en de monobactam aztreonam. Hierbij gaat het niet om resistentie tegen ‘laatste redmiddel’ antibiotica maar om resistentie tegen derde-generatie cefalosporines. De ontstane ESBL bacteriën blijven gevoelig voor andere bètalactam-antibiotica, zoals carbapenems. Modificatie van de doelgenen, zoals bijvoorbeeld de ompF effluxpomp met affiniteit voor carbapenems, kan wel bijdragen aan carbapenemresistentie, maar kan voor zover bekend geen volledige resistentie veroorzaken.^{15,16}

Er kan tijdens de voorgenomen werkzaamheden niet geheel uitgesloten worden dat er bredere antibioticaresistentie tegen meerdere soorten antibiotica en verminderde gevoeligheid of mogelijk resistentie voor carbapenems ontstaat. Echter de voorgestelde modificaties zijn uitsluitend gerelateerd aan het beïnvloeden van antibioticaresistentiegenen en er zijn geen aanwijzingen dat de modificaties zullen leiden tot hogere virulentie of pathogeniteit. Ook zal als aanvullend voorschrift, voordat met een *E. coli* isolaat gewerkt wordt, met behulp van een ‘Minimal Inhibitory Concentration’ (M.I.C) assay worden getest of deze nog steeds gevoelig is voor verschillende carbapenems. Hierdoor wordt mogelijke carbapenemresistentie na de aangebrachte modificaties gemonitord. Daarnaast zullen als aanvullende maatregelen handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen worden en open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II worden uitgevoerd. Met inachtneming van deze maatregelen, acht de COGEM de kans op verspreiding naar mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-II en de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften, de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). www.bacterio.net/escherichia.html (bezocht: 25 januari 2024)
2. Schaechter M (2009). *Escherichia coli*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)

3. Tenaillon O *et al.* (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207-217
4. Savageau MA (1983). *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Nat.* 122: 732-744
5. Kaper JB (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140
6. Lister SA & Barrow P (2008). *Enterobacteriaceae*. In: Poultry diseases, sixth edition, Ed. Pattison M *et al.*, Elsevier Ltd, Amsterdam
7. 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
8. Bahrani-Bougeot FK *et al.* (2009). Enteropathogenic infections. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
9. 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
10. McKenna M (2013). The last resort. *Nature* 499: 394-396
11. 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
12. COGEM (2023). Advies actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van bacteriën. COGEM advies CGM/ 231011-01
13. COGEM (2019). Advies inschaling werkzaamheden met gg-*E. coli* en gg-*S. Typhimurium*. COGEM advies CGM/ 190404-01
14. Mroczkowska JE & Barlow M (2008). Fitness trade-offs in blaTEM evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2340-2345
15. Yang WT *et al.* (2022). Comparative genomics revealed fluoroquinolone resistance determinants and OmpF deletion in Carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 13: 886428
16. Tian X *et al.* (2020). Molecular mechanisms and epidemiology of Carbapenem-resistant *Escherichiacoli* isolated from Chinese patients during 2002-2017. *Infect. Drug Resist.* 13:501-512.