

## Uttalelse fra Hovedkomiteen i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 27.10.05

### Helse- og miljøvurdering knyttet til antibiotikaresistensmarkørgener i genmodifiserte planter

#### BAKGRUNN

EUs utsetningsdirektiv har et krav om at antibiotikaresistensmarkørgener (ARMG) i genmodifiserte planter (GMP) som kan ha ugunstige effekter på miljø eller menneskers helse skal fases ut. På grunn av kravet til harmonisering etter EØS-avtalen ønsket norske myndigheter en faglig vurdering av innretningen på gjeldende norsk regulering på området.

I sin bestilling viser Mattilsynet til at European Food Safety Authority (EFSA)s GMO-panel har vurdert aktuelle ARMG til bruk som markørgener i GMP vedrørende mulige uheldige effekter på human helse og miljø.

EFSA-panelet inndeler ARMG i tre grupper som ansees å ha ulikt potensiale for å påvirke human helse eller miljøet.

Gruppe I er gener som blant annet uttrykker resistens mot kanamycin (*nptII*) og hygromycin (*hpt*). EFSA's GMO-panel mener at *nptII*-genet har vist seg å være trygt i bruk i genmodifiserte planter (GMP) ut fra den erfaring som er bygget opp i løpet av de 14 år som det har vært i bruk og ut fra det faktum at resistens mot denne gruppen antibiotika allerede er utbredt i naturlig forekommende bakterier hos mennesker og i miljøet. EFSA's GMO-panel ser derfor ingen grunn til å legge restriksjoner på bruk av markørgenene i denne gruppen, verken for kommersiell bruk eller for feltforsøk.

Gruppe II inkluderer gener som uttrykker resistens mot blant annet kloramfenikol, ampicillin, streptomycin og spectinomycin. EFSA's GMO-panel mener at disse genene kun skal tillates brukt i GMP til feltforsøk og ikke til kommersiell bruk.

Gruppe III består av gener som uttrykker resistens mot klinisk svært viktig antibiotika som amikacin og tetracyklin. Derfor mener EFSA's GMO-panel at disse gener ikke bør brukes i GMP verken i feltforsøk eller i GMP tilkommersielt bruk.

Ledelsen i VKMs hovedkomité kom fram til at oppdraget berører områder under faggruppene 1 og 3. Saken er derfor behandlet i disse to faggruppene forut for behandlingen i Hovedkomiteen. En ad hoc-gruppe fikk i oppdrag å gi VKM et vitenskapelig grunnlag for risikovurderingen. Gruppen leverte første utkast av sin rapport til Hovedkomiteen 29/8. Denne ligger til grunn for VKMs behandling av saken.

Ad hoc gruppen hadde følgende medlemmer:

- Ingolf Nes, Leder (faggruppe 3)
- Knut G. Berdal, (faggruppe 3)
- Hilde Kruse (faggruppe 1)
- Kaare Magne Nielsen (ekstern ekspert, universitetet i Tromsø)
- Arnfinn Sundsfjord (ekstern ekspert, universitetet i Tromsø)

VKM fikk opprinnelig tidsfrist til 18. mars 2005 fra Mattilsynet. Da vurderingen ble tidkrevende og berører flere faggrupper kunne fristen ikke holdes. Saken ble behandlet på et ekstraordinært møte i VKMs hovedkomité 2. september. Konklusjoner fra dette møtet ble oversendt Miljøverndepartementet 8. september. Kommentarer fra det ekstraordinære møtet innarbeides i ad hoc-gruppens rapport og uttalelsen fra Hovedkomiteen, som sluttbehandles på ordinært møte 11. oktober.

## **OPPDRAG FRA MATTILSYNET**

Oppdraget var formulert som følger: Det bes om at det utføres en vitenskaplig vurdering av risiko for helse og miljø knyttet til bruk av ulike typer antibiotikaresistensgener (ARG) i GMO. Vurderingen skal påpeke eventuell kunnskapsmangel og usikkerhet knyttet til denne risikoen. Den skal også ta i betraktning behovet for bruk av ARG i GMO, alternativer til ARG og eventuell risiko knyttet til alternativene. Endelig skal vurderingen ta i betraktning resistenssituasjonen i Norge sammenliknet med situasjonen i andre europeiske land og bruk av antibiotika i human- og veterinærmedisin i Norge.

## **VURDERING**

Ad hoc-gruppens rapport ”An assessment of potential long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in GMOs based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway” er vedlagt (lenke).

### **INNHold I AD HOC-GRUPPENS RAPPORT**

Ad hoc-gruppen besluttet å vurdere eventuelle helse- og miljøeffekter kun for de ARMG som EFSA's GMO-panel har plassert i gruppene I og II. For ARMG i gruppe III er EFSA-panelets anbefalinger i samsvar med gjeldende norsk lovgivning på området. En ny norsk vurdering er derfor ikke nødvendig for denne gruppen.

EFSA's GMO-panel grupperer ARMG på basis av to kriterier:

- tilstedeværelse av de aktuelle ARMG i bakterier fra jord, planter, vann eller mage/tarm hos mennesker og dyr.
- den kliniske betydningen av de aktuelle antibiotika i human- og veterinærmedisin

Ad hoc gruppen har merket seg at det er klare forskjeller mellom de europeiske land når det gjelder disse to kriteriene. Derfor har ad hoc gruppen konsentrert seg om forhold av betydning for langsiktige effekter av å introdusere ARMG i Norge, norske forekomster av resistensgener og bruk av antibiotika i Norge. Ad hoc gruppen har kun vurdert eventuelle effekter av ARMG som finnes i GMP.

Ad hoc gruppen har støttet seg på de vitenskapelige funn og anbefalinger som er publisert i EFSA's uttalelse fra april 2004. Gruppen har også gjort egne søk i den tilgjengelige vitenskapelige litteraturen for å finne ut om ARMG utgjør en risiko, om nasjonale eller regionale nivåer av resistensgener og antibiotikabruk stemmer overens med det som er lagt til

grunn i EFSA's uttalelse og deres begrunnelse for den foreslåtte grupperingen av ARMG.

Ad hoc gruppen har gjennomgått følgende forhold som grunnlag for vurderingene i sin rapport:

- Mulige toksikologiske, allergi- og miljømessige effekter av proteinprodukter fra ARMG:
  - *Akutt toksisitet*
  - *Allergi forårsaket av eksponering for ARMG-produkter*
  - *Akkumulering av ARMG-produkter i miljøet*
  - *Inaktivering av oralt administrerte antibiotika forårsaket av ARMG-produkter i mat*
- Mulige helseeffekter forårsaket av opptak av intakte ARMG i pattedyrceller:
  - *Opptak i epitelceller (celler i tarm og andre overflater)*
  - *Transport og opptak av ARMG i andre vev*
- Endring i effekt av antimikrobiell behandling etter en mulig horisontal overføring av ARMG til bakterier
  - *Forhold og mekanismer som kan føre til horisontal overføring av ARMG og genuttrykk i relevante miljøer*
    - Frigjøring av ARMG fra GMP
    - DNA-stabilitet i mat og fôr
    - DNA-stabilitet i mage-tarmkanalen
    - Opptak av ARMG i tarmbakterier
    - Opptak av ARMG i matbårne bakterier
  - *Eksperimentelle studier av horisontal overføring av ARMG fra GMP til bakterier*
    - Laboratiestudier av bakterier under eksponering for ARMG eller GMP
    - Studier av bakteriepopulasjoner som eksponeres for ARMG i naturlig miljø
  - *Resistensmekanismer og prevalens av ARMG-homologi i bakteriepopulasjoner*
    - Aminoglykosider, resistensmekanismer og prevalens av resistensgener
    - Ampicilin, resistensmekanismer og prevalens av resistensgener
    - Kloramfenikol, resistensmekanismer og prevalens av resistensgener
  - *Betingelser som kan favorisere vekst hos bakterier med ARMG*
- Usikkerheter i vurderingene og kunnskapsbehov vedrørende
  - *effekter forårsaket av eksponering for ARMG-produkter*
  - *effekter forårsaket av human eksponering for eller opptak av intakte ARMG*
  - *effekter av horisontal overføring av ARMG til bakterier*

#### **PRESISERINGER VEDRØRENDE MOMENTER I AD HOC-GRUPPENS RAPPORT**

##### **Mulige toksikologiske, allergi- og miljømessige effekter av proteinprodukter fra ARMG: (pkt 3.1.5):**

I vitenskapelige tidsskrifter er det publisert kun få eksperimentelle studier som har hatt som mål å avsløre eventuelle toksiske, allergi- og miljømessige konsekvenser forårsaket av proteiner som uttrykkes av ARMG. Det finnes imidlertid konfidensielle rapporter lagt fram blant annet i forbindelse med søknader om godkjenning. Informasjon fra slike gir også informasjon som brukes i utviklingen av offisielle prosedyrer for risikovurdering og godkjenning.

Risikovurderinger av produkter av resistensgener i Gruppe I, konkluderer med lav eller ubetydelig risiko knyttet til slike forhold ved disse proteinene. Storparten av vurderingene er hovedsakelig basert på komparative erfaringer og slutninger heller enn direkte eksperimentelle – og epidemiologiske studier. Tester av *nptII*-proteinets stabilitet i simulert mage-tarmsaft viser at proteinet hydrolyseres hurtig i slike tester. Det er derfor liten grunn til

å anta at proteinet hydrolyseres annerledes enn andre hydrolyserbare proteiner. Antagelsene om neglisjerbar risiko baserer seg altså hovedsakelig på fravær av rapporterte effekter på mennesker og miljø av eksponering for tilsvarende naturlig forekommende ARMG-produkter. Konsentrasjonen i miljøet er imidlertid ofte ukjent.

Ad hoc-gruppen konkluderer som følger etter å ha gått i gjennom EFSAs uttalelse og den tilgjengelige vitenskapelige litteraturen: Det finnes ingen dokumentasjon som tilsier at det i Norge er særlige forhold vedrørende toksikologiske, allergi- og miljømessige forhold som krever spesielle sikkerhetsforanstaltninger eller reguleringer når det gjelder proteiner som uttrykkes av gruppe 1 ARMG.

Videre sier ad hoc-gruppen følgende: På grunn av den svært begrensede frigjøring til miljøet av proteiner som uttrykkes av Gruppe II ARMG anser ad hoc-gruppen at slike proteiner ikke utgjør en helse- eller miljørisiko.

### **Mulige helseeffekter forårsaket av opptak av intakte ARMG i pattedyrceller (pkt 3.2.3)**

Mennesker inntar daglig mellom 0,1 og 1 gram DNA gjennom kosten, for kyr er mengden rundt 60 gram. Det finnes ingen rapporter som tilsier at dette gir helse- eller miljømessige problemer. Imidlertid mangler detaljerte kunnskaper om nedbrytning i tarm, opptaks-mekanismer, transportveier og nedbrytningsdynamikk vedrørende DNA i mat som gjenfinnes i pattedyrs blodomløp. Mangel på informasjon om størrelse og mengder av DNA fragmenter etter nedbrytning i tarmen gjør det vanskelig å forutsi lokalisering og eksponering for fragmentene. Dersom slike fragmenter skulle inneholde ARMG og disse blir tatt opp i pattedyrceller, er det en teoretisk mulighet for at proteiner fra ARMG kan uttrykkes. Det samme gjelder andre DNA fragmenter som tas opp via fordøyelsessystemet. Eventuelle virkninger av proteiner fra fremmed DNA på andre proteiner som finnes naturlig i pattedyrceller er ikke undersøkt.

Selv om det mangler kunnskap på dette området, er ad hoc-gruppen av den mening at eksponering for ARMG må sees i forhold til den totale daglige eksponeringen av DNA som stammer fra den maten vi spiser. Ad hoc-gruppen kjenner ikke til eksperimentelle data som skulle tilsi at utilsiktet opptak eller uttrykk av ARMG eller andre DNA-molekyler fra mat i pattedyrceller, vil føre til skade. Det har ikke vært rapportert at ARMG eller andre DNA-molekyler inntatt fra mat kan uttrykkes i pattedyrceller. Ad hoc-gruppen har heller ikke identifisert landsspesifikke forhold som krever spesielle sikkerhetsforanstaltninger eller reguleringer av ARMG i Norge sammenlignet med EU dersom disse skulle bli tatt opp i pattedyrceller.

### **Resistensmekanismer og prevalens av ARMG-homologi i bakteriepopulasjoner (pkt 3.3.3)**

**Gruppe I ARMG.** Litteraturstudier viser at *nptII*-genet forekommer kun sporadisk i miljøet og i kliniske isolater. Høyere forekomst kan muligens finnes i gjødsel i enkelte land da bruken av neomycin og kanamycin i husdyrbruk varierer mellom de ulike land. Fenotypiske resistensdata som er innsamlet fra husdyr i Norge siden 1997 viser at en svært lav andel av de undersøkte *E. coli* inneholder *nptII*-genet. Pga det høye bakterieantallet i et enkeltindivid vil *nptII*-genet, der det er tilstede, kunne finnes i mange bakterier. Dataene er ufullstendige, men nivåene i Norge ser ut til å være omtrent som i andre europeiske land. Det er behov for mer informasjon om forholdene i Norge.

Det er svært lite informasjon vedrørende forekomsten av *hpt*-genet.

**Gruppe II ARMG.** Ad hoc-gruppen mener at det ikke er sannsynlig at *bla<sub>TEM-1</sub>*-allelet er tilstede i høye konsentrasjoner i bakterier som er utbredt i naturen i Norge. Lite informasjon

finnes om forekomsten av dette genet i apatogene humane isolater. Data over forekomst av ampicillin-resistens i bakterier fra dyr tyder på liten tilstedeværelse i miljøet av *bla<sub>TEM-1</sub>*-genet. Imidlertid viser studier av *E. coli* og andre mage/tarm-bakterier at *bla<sub>TEM-1</sub>*-genet finnes i >20 % av kliniske bakterieisolater fra human tarmflora. Streptomycinresistensen (*str*) ser ut til å være svært utbredt i forskjellige habitater i Europa. Sammenlignbare data finnes ikke for Norge, men det er sannsynlig at vi har den samme situasjonen. Lite er kjent om utbredelsen av kloramfenikolresistensen (*cat*) i Europa, men informasjon som foreligger om forekomsten av kloramfenikol-resistens i bakterier hos dyr tyder på liten utbredelse av dette genet.

Ad hoc-gruppen finner at data over utbredelse av bakteriestammer med ARMG og lokalisering av naturlig forekommende ARMG-homologer i forskjellige miljøer, er svært mangelfulle. Dette gjør det vanskelig å forutse om introduksjon av GMP som inneholder ARMG vil endre konsentrasjonen og påvirkningsmåter av ARMG for klinisk relevante bakterier.

Med den bruken av antibiotika som er registrert i Norge, mener ad hoc-gruppen at positiv seleksjon av bakterier med ARMG (og naturlig forekommende homologer) kan forekomme under visse betingelser. Observasjonen av positiv forsterkning av ARMG i bakterier må sees i forhold til eksponering (nivå og sted) av bakterier til naturlig forekommende ARMG-homologer ved de samme betingelser.

Tilgjengelige eksperimentelle studier viser at horisontal overføring av ARMG etter all sannsynlighet inntreffer sjelden og at denne overføringen finner sted når det forekommer DNA sekvenser med likhet mellom overført DNA (som inneholder ARMG) og bakterien som er mottaker. Til tross for flere forsøk er genoverføring fra GMP til bakterier aldri påvist når det ikke finnes sekvenshomologi i DNA mellom dem. Studier viser at sannsynligheten for at overføring av ARG fra en bakterie til en annen bakterie med sekvens-homologi er mer enn en milliard ganger større enn ved fravær av slik homologi

#### **Betingelser som kan favorisere vekst hos bakterier med ARMG (pkt 3.3.4)**

Identifisering og kvantifisering av selektive betingelser som påvirker vekst og formering av bakterier som inneholder ARMG er nødvendig for å forstå potensialet for rask oppformering av bakterier som nylig har fått resistensegenskaper. Våre kunnskaper når det gjelder bakterieseleksjon i komplekse miljøer er sporadiske og svært vanskelige å kvantifisere. Bruk og lokalisering av bruk av antibiotika gir en indikasjon om hvilke miljøer som stimulerer utviklingen av bakterier med ARMG. Bortsett fra *hpt*-genet som koder for resistens mot hygromycin koder alle ARMG i Gruppe I og II for resistens mot antibiotika som benyttes i Norge.

#### **Endring i effekt av antimikrobiell behandling etter en mulig horisontal overføring av ARMG til bakterier (pkt 3.3 og 3.3.3.4)**

Ad hoc-gruppen oppsummerer som følger: Horisontal genoverføring er en viktig faktor i bakteriers evolusjon og tilpasning. Selv om vitenskapelige studier indikerer at bakteriers genomer har en naturlig eksponering for plantegener, vil opptak hindres av en rekke naturlige biologiske barrierer. Enkelte av disse barrierene er imidlertid fraværende eller svekkede i genkonstruktene som er satt inn i GMP. Den betydelige økningen i frigjøring av ARMG til miljøet som bruk av ARMG-holdige GMP vil representere, vil medføre en uønsket økning i eksponeringsnivå, en økt utbredelse og nye veier for eksponering av bakterier for ARMG. I en "worst case"-betraktning må det antas at GMP med ARMG vil øke forekomsten av resistente bakterier.

**Gruppe I ARMG.** Ad hoc-gruppen mener at de tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskapene om forekomsten av ARMG i

miljøet er imidlertid mangelfulle. Videre mener gruppen at den veterinære bruken i Europa, inkludert i Norge, av aminoglykosider slik som neomycin kan gi selektive betingelser for bakterietransformanter som har tatt opp ARMG. Ad hoc-gruppen mener likevel at tilstedeværelse av *nptII*-genene i GMP ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier sammenlignet med de *nptII*-genene som allerede er tilstede i bakteriepopulasjonene.

Det finnes lite informasjon om utbredelsen til *hpt*-genet. På grunn av den begrensede kliniske relevansen i human- og veterinærmedisin av det tilsvarende antibiotikum ser ad hoc-gruppen likevel ingen grunn til bekymring for bruken av *hpt*-genet som markør i GMP.

**Gruppe 2 ARMG.** *bla<sub>TEM-1</sub>*-genet og *str*-genet ser ut til å ha stor utbredelse i kliniske prøver i Europa, inkludert i Norge. For *bla<sub>TEM-1</sub>*-genet er forekomsten i miljøet og hos dyr imidlertid begrenset. Bruk av disse genene som markører i GMP kan derfor utgjøre et begrenset bidrag til den totale forekomsten av disse genene (kopinummer) i mennesker i Norge. Mindre informasjon er tilgjengelig vedrørende forekomsten av *cat*-genet. *bla<sub>TEM-1</sub>*-genet og *str*-genet koder for resistens mot antibiotika som er i utstrakt klinisk bruk både i human og veterinærmedisin i Norge. Den utstrakte bruken og nytten av disse antibiotikaene gjør at forsiktighet bør utvises ved bruk av GMP med de tilsvarende resistensgenene i miljøer som kan favorisere bakterier som har slike gener.

## HOVEDKOMITEENS OPPSUMMERINGER OG KONKLUSJONER

Hovedkomiteen vil understreke og støtte ad hoc gruppens påpekning av kunnskapsmangler og derav følgende usikkerhet i grunnlaget for risikovurderingen. Spesielt gjelder dette på områder hvor en teoretisk ikke kan utelukke hendelser selv om disse antas å opptre svært sjelden. Elementer av den manglende kunnskapen kan imidlertid bare fremskaffes ved bruk i stor skala. Styrking av basisgrunnlaget for forståelse på alle relevante nivåer, fra det molekylærbiologiske nivå til populasjonsnivå, både hos bakterier, dyr og mennesker er ønskelig for å kunne styrke grunnlaget for vurderingen av risiko for helse og miljø av ARMG i GMP. EFSA's GMO-panel antar at risikoen i forbindelse med eksponering for ARMG og deres produkter er liten. Antagelsen bygger i stor grad på generell biologisk forståelse og kunnskap samt det forhold at det ikke finnes rapporter om effekter og hendelser hos mennesker og i miljø som kan spores tilbake til ARMG i GMP eller tilsvarende gener som forekommer naturlig i vårt miljø.

### Konklusjon vedrørende risiko for helse og miljø knyttet til bruk av ulike typer ARMG i GMP

Hovedkomiteen mener inndeling av ARMG inn i tre grupper som benyttes av EFSA's GMO-panel kan brukes også for norske forhold. (Se side 1)

Hovedkomiteen støtter EFSA's vurdering av risiko angående ARMG i Gruppe II og III. EFSA's GMO-panel uttaler vedrørende ARMG i Gruppe II: disse genene skal kun tillates brukt i GMP til feltforsøk og ikke til kommersiell bruk og vedrørende ARMG i Gruppe III: disse gener bør ikke brukes i GMP verken i feltforsøk eller i GMP til kommersielt bruk.

Når det gjelder Gruppe I mener VKMs hovedkomité at en økt bruk av *hpt*-genet som markør i GMP vil utgjøre en ubetydelig risiko for helse og miljø. For *nptII*-genet mener hovedkomiteen at en økning i forekomsten av dette genet kan utgjøre en noe større risiko enn for *hpt*-genet, men risikoen anses likevel som lav.

Behovet for bruk av ARMG i GMP, alternativer til bruk av ARMG i GMP og eventuell risiko knyttet til alternativene er ikke vurdert. Teknologien for alternative markører er svært lite beskrevet. Ad hoc-gruppen anser derfor oppgaven om å vurdere alternativer og risiko knyttet til disse alternativene som svært krevende og mener at dette bør være en vurdering for seg. Av

den grunn er vurderingen om sikkerheten av alternative markører ikke inkludert i den foreliggende rapporten.

## **VURDERT AV**

### Hovedkomiteen:

Jan Alexander, Lene Frost Andersen, Knut Bøe, Erik Dybing, Wenche Farstad, Gro-Ingunn Hemre, Åshild Krogdahl (leder), Hilde Kruse, Øyvind Lie, Ingolf Nes, Bjørn Næss, Janneche Utne Skåre, Leif Sundheim

Koordinator(er) fra sekretariatet: Arne Mikalsen, Siamak Yazdankhah og Beate Folgerø

## **TAKK TIL**

Hovedkomiteen takker Ingolf Nes, Knut Gunnar Berdal, Hilde Kruse, Kaare Magne Nielsen og Arnfinn Sundsfjord for deres viktige bidrag til dette arbeidet gjennom rapporten ”An assessment of potential long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in GMOs based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway”.