

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 26 juni 2017
KENMERK CGM/170626-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Mycobacterium neoaurum*

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Werkzaamheden met een ongeklasseerd micro-organisme' (IG 17-093_2.8-000), ingediend door Rijksuniversiteit Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacterie *Mycobacterium neoaurum* en de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 4 van de Regeling ggo (indeling in klassen van pathogene micro-organismen).

M. neoaurum is een gepigmenteerde, zuurvaste, snelgroeiende mycobacterie en komt algemeen voor in de bodem. Mens, dier en plant komen veelvuldig met de bacterie in aanraking. Wetenschappelijk onderzoek naar de bacteriesoort richt zich vooral op het bacteriële steroïde metabolisme.

Infecties veroorzaakt door *M. neoaurum* komen zelden voor en alleen bij patiënten die immuungecompromiteerd zijn of een onderliggend ziektebeeld hebben.

De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat *M. neoaurum* ziekte bij gezonde mensen, dieren of planten veroorzaakt. Daarom is zij van mening dat *M. neoaurum* een opportunistisch pathogeen is, en adviseert zij *M. neoaurum* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.



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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangenverstremeling is het COGEM lid prof. dr. ir. D.J. van Elsas niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Pathogeniteitsclassificatie van *Mycobacterium neoaurum*

COGEM advies CGM/170626-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Rijksuniversiteit Groningen (IG 17-093) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Mycobacterium neoaurum* en plaatsing van deze bacterie op Bijlage 4 van de Regeling ggo (indeling in klassen van pathogene micro-organismen).¹ De aanvrager wil met *M. neoaurum* stam NRRL B-3805 (DSM 2967) gaan werken.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling 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.

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 genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo)¹ geplaatst worden. Bijlage 2, lijst A1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumrestricties met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden, indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

3. Mycobacteriën

Het genus *Mycobacterium* behoort tot de familie der *Mycobacteriaceae*.^{2,3} Mycobacteriën zijn zuurvaste staafvormige bacteriën, die beschikken over een dikke celwand met een hoog gehalte aan vetzuren.⁴ Deze celwand biedt bescherming tegen uitdroging, antimicrobiële agentia, hoge temperaturen en lage zuurgraden.⁴ Mycobacteriën zijn alom tegenwoordig in het milieu en worden aangetroffen in onder meer de bodem, stof en water.^{4,5,6,7,8} Tevens kunnen de bacteriën biofilms vormen.⁵ Op basis van groeisnelheid worden er drie groepen onderscheiden: langzaam groeiende (volgroeide kolonies op vast medium na 4 tot 6 weken), middelmatig groeiende en snel groeiende mycobacteriën (volgroeide kolonies op vast medium na 7 dagen).⁹

Het genus *Mycobacterium* omvat zowel pathogene als apathogene bacteriesoorten. Voorbeelden van pathogene soorten zijn *Mycobacterium tuberculosis*, de verwekker van de longziekte tuberculose (TBC), en *Mycobacterium leprae*, de verwekker van lepra. Jaarlijks sterven er miljoenen mensen aan TBC.^{10,11} Mycobacteriën die longinfecties met TBC-achtige ziekteverschijnselen veroorzaken, maar niet tot de soort *M. tuberculosis* behoren, worden 'atypische' of non-tuberculeuze mycobacteriën genoemd.^{12,13} In het algemeen wordt aangenomen dat pathogene mycobacteriën langzamer groeien en een kleiner genoom hebben dan apathogene mycobacteriën.¹⁴

3.1 *Mycobacterium neoaurum*

M. neoaurum is een gepigmenteerde, snelgroeiende mycobacterie,⁹ en is in 1972 voor het eerst in de literatuur beschreven.⁶ De bacterie behoort tot het '*Mycobacterium parafortuitum* complex', en is nauw verwant aan *M. bacteremicum* en '*Mycobacterium lacticola*'.^{8,15,16,17} *M. lacticola* is tot op heden niet als een officiële soort erkend.² *M. neoaurum* is alleen door middel van 'multi locus sequence typing' (MLST) van *M. bacteremicum* en *M. lacticola* te onderscheiden.¹⁵ Wetenschappelijk onderzoek naar de bacteriesoort richt zich vooral op het bacteriële steroïde metabolisme.^{18,19,20,21,22} Sinds 1972 wordt met *M. neoaurum* stam NRRL B-3805 gewerkt.¹⁸ Van vier verschillende *M. neoaurum* stammen is de genoomsequentie gepubliceerd. Het genoom omvat 5,4 tot 5,5 megabaseparen.^{23,24}

3.2 *Mycobacterium neoaurum* infecties

M. neoaurum is diverse keren geassocieerd met katheter gerelateerde bloedbaaninfecties, en incidenteel geassocieerd met onder meer meningo-encefalitis, urineweg-, long- en huidinfecties.^{17,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35} Op één uitzondering na, betrof dit patiënten met een onderliggend ziektebeeld, zoals patiënten met een verzwakt immuunsysteem. De uitzondering betrof een door *M. neoaurum* veroorzaakte longinfectie bij een patiënt zonder medische voorgeschiedenis.³⁵ Deze patiënt had geen katheters, of arteriële of intraveneuze lijnen.

Achteraf bleek dat bij een deel van de hierboven vermelde ziektegevallen het ziekteverwekkende agens onjuist was gedetermineerd, of dat de identificatie niet door middel van moleculaire technieken (sequentie-analyse *16S rRNA* gen of MLST) is bevestigd.^{25,29,31,32}

Bij een studie in Taiwan is over een periode van acht jaar geïnventariseerd wat de incidentie van longinfecties veroorzaakt door non-tuberculeuze mycobacteriën was.¹³ Op een totaal van 4786 patiënten werd *M. neoaurum* slechts eenmaal geïsoleerd.³⁴ Het betrof een patiënt met nierfalen.

Een enkele maal wordt er in de literatuur melding gemaakt van het voorkomen van *M. neoaurum* bij dieren. Zo is *M. neoaurum* geïsoleerd uit ogenschijnlijk gezond wild, en bij ingevroren vis bestemd voor consumptie.^{36,37} In beide studies is de identificatie van de bacterie bevestigd door middel van sequentie-analyse van het *16S rRNA* gen. In een experimenteel muizenmodel, waar *M. neoaurum* intraperitoneaal werd toegediend, ontwikkelden de dieren een chronische longinfectie.³⁸

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over *M. neoaurum*. In de actualisatie van de lijsten met de indeling in pathogeniteitsklassen zijn veel *Mycobacterium* soorten geclassificeerd.³⁹ Deze soorten zijn allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 met uitzondering van *M. africanum*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. microti*, *M. tuberculosis* en *M. ulcerans*, welke zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Er komen geen apathogene *Mycobacterium* soorten op de lijst voor.

5. Classificaties andere beoordelende instanties

De 'American Type Culture Collection' (ATCC), die pathogeniteit voor de mens in ogenschouw neemt, heeft 10 stammen van *Mycobacterium neoaurum* ingedeeld op biosafety level (BSL) 1, en één stam op BSL 2 (ATCC 23069, DSM 43993).⁴⁰ Vier van de 'BSL 1' stammen blijken op basis van MLST in feite *M. lacticola* te zijn.¹⁵ Van de overige zes 'BSL 1' stammen, waaronder 'type strain' ATCC 25795 (DSM 44074), is op basis van MLST bevestigd dat het *M. neoaurum* stammen zijn.¹⁵ Van de stam die ingedeeld is op BSL 2 (ATCC 23069, DSM 43993), is het onduidelijk of het daadwerkelijk *M. neoaurum* betreft. Hoewel de ATCC de stam als *M. neoaurum* vermeldt, is deze aangeleverd als *Mycobacterium szulgai*, tot *Mycobacterium tomidae* hernoemd, maar ook als *Mycobacterium intracellulare* geïdentificeerd.^{41,42}

De 'type strain' van *M. neoaurum* (ATCC 25795, DSM 44074) is door de ATCC ingedeeld op BSL1. Door de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' (DSMZ), die pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, beschouwt de 'type strain' als een micro-

organisme van risicogroep 2.^{2,40,43} Stam NRRL B-3805 (DSM 2967), die de aanvrager wil gaan gebruiken, is door de DSMZ eveneens ingedeeld in risicogroep 2.⁴³

6. Overweging en advies

M. neoaurum komt algemeen voor in de bodem.^{8,18,20,21} Mens, dier, plant komen veelvuldig met de bacterie in aanraking. De mycobacterie is bij dieren aanwezig zonder dat deze op het oog waarneembare ziekteverschijnselen vertonen. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat *M. neoaurum* pathogeen is voor planten. De mycobacterie kent een lange historie van veilig gebruik bij wetenschappelijk onderzoek naar industriële toepassingen.

M. neoaurum veroorzaakt zelden infecties en alleen bij patiënten met een onderliggend ziektebeeld, of bij mensen en dieren waarbij de natuurlijke barrière doorbroken is (aangebrachte katheters, intraveneuze of arteriële lijnen, intraperitoneale toediening bij muizen). Omdat de bacterie alleen met behulp van geavanceerde technieken gedetermineerd kan worden die niet op standaard diagnostische laboratoria aanwezig zijn, kan de COGEM eventuele onderrapportage niet uitsluiten.

Voor zover bij de COGEM bekend, is er eenmaal melding gemaakt van een niet-opportunistische *M. neoaurum* infectie.³⁵ De COGEM merkt op dat in deze publicatie geen gegevens worden aangeleverd die de immunocompetentie van de patiënt ondersteunen, noch worden er enige follow-up gegevens aangeleverd. Zij is daarom van mening dat niet uitgesloten kan worden dat dit ziektegeval een opportunistische infectie betrof.

De COGEM merkt op dat op basis van de gepubliceerde genomsequentiegegevens, *M. neoaurum* geen bekende virulentiefactoren en toxinegenen lijkt te bezitten.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van mening dat *M. neoaurum* een opportunistisch pathogeen is. Zij adviseert daarom *M. neoaurum* in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezocht: 22 juni 2017)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). www.bacterio.net/mycobacterium.html (bezocht: 15 juni 2017)
3. Skerman VBD *et al.* (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 30: 225-420
4. Saier MH (2009). Cell structure chemical composition. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
5. De Groot MA & Huitt G (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 42: 1756-1763
6. Tsukamura M (1972). A new species of rapidly growing scotochromogenic mycobacteria. *Mycobacterium neoaurum*. *Med. Biol.* 85: 229-233
7. Marsheck WJ *et al.* (1972). Microbial degradation of sterols. *App. Microbiol.* 23: 72-77

8. Tsukamura M *et al.* (1983). Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. nov., nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 460-469
9. Runyon EH (1970). Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. Am. J. Clin. Pathol. 54: 578-586
10. Fitzgerald DW *et al.* (2016). *Mycobacterium tuberculosis*. In: Principles and practice of infectious diseases. Eighth edition. Eds Bennett JE *et al.* Elsevier.
<https://expertconsult.inkling.com/store/book/mandell-douglas-bennetts-infectious-diseases-8/> (bezocht: 19 juni 2017)
11. WHO (2017). Tuberculosis. Factsheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/ (bezocht: 15 juni 2017)
12. Stout JE *et al.* (2016). Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. Int. J. Infect. Dis. 45: 123-134
13. Lai CC *et al.* (2010). Increasing Incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. Emerg. Infect. Dis. 16: 294-296
14. Rahman SA *et al.* (2014). Comparative analyses of nonpathogenic, opportunistic, and totally pathogenic mycobacteria reveal genomic and biochemical variabilities and highlight the survival attributes of *Mycobacterium tuberculosis*. MBio. 5. doi: 10.1128/mBio.02020-14
15. Simmon KE *et al.* (2009). Phylogenetic analysis of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium neoaurum* with redescription of *M. aurum* culture collection strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1371-1375
16. Kiska DL *et al.* (2004). First case report of catheter-related bacteremia due to 'Mycobacterium lacticola'. J. Clin. Microbiol. 42: 2855-2857
17. Brown-Elliott BA *et al.* (2010). *Mycobacterium neoaurum* and *Mycobacterium bacteremicum* sp. nov. as causes of mycobacteremia. J. Clin. Microbiol. 48: 4377-4385
18. Marsheck WJ *et al.* (1972). Microbial degradation of sterols. Appl. Microbiol. 23: 72-77
19. Goren T *et al.* (1983). 1-Ene-steroid reductase of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805. J. Steroid Biochem. 19: 1789-1797
20. Wei W *et al.* (2010). A new steroid-transforming strain of *Mycobacterium neoaurum* and cloning of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in NwIB-01. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 1446-1456
21. Shao M *et al.* (2015). Enhanced production of androst-1,4-diene-3,17-dione by *Mycobacterium neoaurum* JC-12 using three-stage fermentation strategy. PLoS One. 10: e0137658
22. Liu M *et al.* (2016). Single nucleotide polymorphism analysis for the production of valuable steroid intermediates in *Mycobacterium neoaurum*. Biotechnol. Lett. 38: 1881–1892
23. Rodríguez-García A *et al.* (2016). Complete genome sequence of *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805, an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols. J. Biotechnol. 224: 64-65
24. *Mycobacterium neoaurum* genome assembly and annotation report.
www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/15728 (bezocht: 16 juni 2017)

25. Davison MB *et al.* (1988). Bacteremia caused by *Mycobacterium neoaurum*. J. Clin. Microbiol. 26: 762-764
26. Woo PC *et al.* (2000). Identification of *Mycobacterium neoaurum* isolated from a neutropenic patient with catheter-related bacteremia by 16S rRNA sequencing. J. Clin. Microbiol. 38: 3515–3517
27. Zanetti S *et al.* (2001). Isolation and identification of *Mycobacterium neoaurum* from a patient with urinary infection. New Microbiol. 24:189–192
28. Becker ML *et al.* (2003). *Mycobacterium neoaurum* bacteremia in a hemodialysis patient. Can. J. Inf. Dis. 14: 45-48
29. Heckman GA *et al.* (2004). Rapidly progressive dementia due to *Mycobacterium neoaurum* meningoencephalitis. Emerg. Infect. Dis. 10: 926-927
30. Morimoto Y *et al.* (2007). Pulmonary infection with *Mycobacterium neoaurum* identified by 16S ribosomal DNA sequencing. J. Infect. 54: 227–231
31. Washer LL *et al.* (2007). *Mycobacterium neoaurum* bloodstream infection: report of 4 cases and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 45: 10–13
32. Martin LK *et al.* (2007). Cutaneous *Mycobacterium neoaurum* infection causing scarring alopecia in an immunocompetent host. Br. J. Dermatol. 157: 204–206
33. Awadh H *et al.* (2016). Bacteremia with an unusual pathogen: *Mycobacterium neoaurum*. Case Rep. Infect. Dis 2016;. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5167874>
34. Lai CC *et al.* (2009). *Mycobacterium neoaurum* infection in a patient with renal failure. Int. J. Infect. Dis. 13: 276-278
35. Kim CK *et al.* (2014). Pulmonary infection caused by *Mycobacterium neoaurum*: the first case in Korea. Ann. Lab. Med. 34: 243-246
36. Pate M *et al.* (2016). *Mycobacterium* spp. in wild game in Slovenia. Vet. J. 208: 93-95
37. Lorencova A *et al.* (2013). Nontuberculous mycobacteria in freshwater fish and fish products intended for human consumption. Foodborne Pathog. Dis. 10: 573-576
38. Wang CF *et al.* (2016). Prominent contribution of Th1, Th17, and Tregs to the host response during *M. neoaurum* infection. Genet. Molec. Res. 15: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038989>
39. COGEM (2014). Actualisatie van de lijsten met de indeling in pathogeniteitsklassen van een groot aantal apathogene- en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/141218-01
40. American Type Culture Collection (ATCC). *Mycobacterium neoaurum*. www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cmycobacterium+neoaurum%7c3%7c.Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=mycobacterium+neoaurum&redir=1 (bezocht: 21 juni 2017)
41. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' (DSMZ). *Mycobacterium neoaurum*. www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-43993.html (bezocht: 21 juni 2017)
42. American Type Culture Collection (ATCC). *Mycobacterium neoaurum* Tsukamura (ATCC 23069). www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/23069.aspx#characteristics (bezocht: 21 juni 2017)
43. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH' (DSMZ). *Mycobacterium neoaurum*. www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-44074.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304 (bezocht: 14 juni 2017)