

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 9 maart 2012
KENMERK CGM/120309-01
ONDERWERP Classificatie en inschaling werkzaamheden *Listeria innocua*

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de classificatie van *Listeria innocua* en werkzaamheden met een deletiemutant van deze bacterie, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de bacterie *Listeria innocua* ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de plaatsing van dit micro-organisme op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en over inschaling van werkzaamheden met een deletiemutant van deze bacteriesoort. Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden. De voorgenomen werkzaamheden zullen bestaan uit het produceren van bacteriofagen waarbij de genetisch gemodificeerde *L. innocua* stam WSLC2627 Δ *flaA* als gastheerorganisme gebruikt zal worden.

L. innocua is alom in het milieu aanwezig en komt van nature als onschadelijke saprofyt op vergane plantenresten voor. Incidenteel zijn er atypische *L. innocua* varianten beschreven die in het bezit zijn van enkele functionele virulentiegenen. De COGEM is van mening dat deze varianten beschouwd kunnen worden als opportunistische pathogenen die alleen ziekte kunnen veroorzaken bij patiënten met een verzwakte weerstand. Zij is van mening dat *L. innocua* niet pathogeen is en adviseert de bacterie in te delen in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1). Tevens acht zij de plaatsing van deze bacterie op Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd. Deletiemutant *L. innocua* WSLC2627 Δ *flaA* acht de COGEM verminderd fit vergeleken met wild type *L. innocua*. De bacteriofaag die met behulp van deze mutant geproduceerd wordt, bezit geen genen, eiwitten of andere factoren die een rol kunnen spelen in de pathogeniteit of virulentie van *L. innocua*. Concluderend acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden onder ML-I inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line and a small dash.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Listeria innocua*

COGEM advies CGM/120309-01

Inleiding

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag door MICREOS B.V. te Wageningen, is de COGEM gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de bacterie *Listeria innocua* ingedeeld dient te worden. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de plaatsing van dit micro-organisme op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en inschaling van werkzaamheden met een deletiemutant van deze bacteriesoort.

MICREOS B.V is een bedrijf dat onderzoek doet naar het toepassen van bacteriofagen in de voedselindustrie.¹ In onderhavige aanvraag wil het bedrijf bacteriofagen opkweken en daarbij als gastheerorganisme gebruik maken van de *L. innocua* deletiemutant.

Het bacterie geslacht *Listeria*

Listeria spp. zijn grampositieve bacteriën die van nature als saprofyt voorkomen op vergane plantenresten die zij als voedingsbron benutten. Ze worden veelvuldig in het milieu aangetroffen (bodem, water, planten) en zijn daarnaast aanwezig in voedsel (vlees, vis, rauwe melkproducten, groente).^{2,3,4} De bacteriën zijn in staat zich onder diverse ongunstige omstandigheden te handhaven en te vermenigvuldigen, zoals onder hoge zoutconcentraties, hoge of lage temperatuur (0- 45 °C) en zuur of basisch milieu (pH 4,5 – 9).³

Listeria soorten beschikken over één tot vijf flagellen (zweepdraden) waardoor de bacterie zich naar energiebronnen kan verplaatsen en gevaarlijke stoffen kan vermijden (chemotaxis).⁴ Met behulp van zijn flagellen kan de bacterie zich aan zijn voedingsbron hechten en biofilms vormen.^{5,6,7,8}

Het geslacht *Listeria* omvat zes soorten: *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* en *Listeria welshimeri*.^{3,4}

Pathogeniteit

Er zijn twee ziekteverwekkende *Listeria* soorten: *L. monocytogenes* en *L. ivanovii*.^{2,3,4,9,10} *L. ivanovii* is pathogeen voor bepaalde diersoorten (herkauwers), *L. monocytogenes* is pathogeen voor mens en dier. Besmetting vindt plaats via de voedselketen.

De ziekte listeriose kan tot abortus, vroeggeboorte, doodgeboorte en prenatale infecties leiden. Daarnaast kan *L. monocytogenes* bij pasgeborenen, oudere mensen en immunogecompromitteerden (patiënten met verminderde weerstand) hersen(vlies)ontsteking en bloedvergiftiging veroorzaken.^{3,4,10} Infecties met *L. monocytogenes* kunnen een dodelijke afloop hebben, maar bij gezonde mensen verloopt een infectie meestal mild en is zelf limiterend.^{2,3,11,12,13}

De soorten *L. grayi*, *L. innocua*, *L. seeligeri* en *L. welshimeri* worden beschouwd als niet pathogeen.^{2,10} In de literatuur is één maal een door *L. innocua* veroorzaakte fatale bacteriëmie bij

de mens gerapporteerd. Het betrof een patiënt die behandeld werd met corticosteroiden.¹⁴ Corticosteroiden werken ontstekingsremmend en onderdrukken het immuunsysteem.

Virulentiefactoren

Het ziekteverwekkende vermogen van *L. monocytogenes* en *L. ivanovii* wordt veroorzaakt door het bezit van verschillende virulentiefactoren. Ze zijn in staat verschillende soorten gastheercellen binnen te dringen, zich intracellulair te vermenigvuldigen en zich naar andere cellen te verspreiden waarbij lysis (vernietiging) van de gastheercel optreedt.^{2,4} Dit proces treedt ook op tijdens de fagocytose door macrofagen, waardoor de bacterie ontsnapt aan het immuunsysteem van de gastheer.^{2,10,15} Beide bacteriesoorten zijn in staat rode bloedcellen te lyseren (hemolyse).

In vergelijkende genomsequentie-analyses is aangetoond dat genen en genclusters coderend voor deze virulentiefactoren, afwezig zijn bij de apathogene, niet-hemolytische bacteriesoort *L. innocua*.^{3,9,15,16} In de literatuur zijn wel enkele atypische, hemolytische *L. innocua* varianten beschreven.¹⁷ Deze stammen bevatten fragmenten van de *L. monocytogenes* en *L. ivanovii* kenmerkende virulentiegenen en genclusters, wat de hemolytische eigenschap van deze varianten verklaart. De varianten worden verondersteld afstammelingen van *L. monocytogenes* te zijn en kunnen bij immuungecompromitteerden ziekte veroorzaken.^{14,17}

Pathogeniteitsklassen

De inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is mede afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van het organisme. Daarom is het voor een correcte inschaling van de werkzaamheden van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse een organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁸ 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. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen 1 en 2 zijn als volgt gedefinieerd:

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- 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;
- van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen beschouwd. Zij kunnen, als aan één van de voor pathogeniteitsklasse 1 geldende voorwaarden is voldaan, in klasse 1 ingedeeld worden.

Bijlage 1

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang, omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.¹⁸ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’ inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen. Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, behoren tot pathogeniteitsklasse 1.

Eerder COGEM advies

Recent heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.¹⁹ Zij heeft geadviseerd de bacteriesoorten *L. ivanovii* en *L. monocytogenes* in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Aangezien de classificatie van *L. innocua* bij de verschillende geraadpleegde bronnen niet eenduidig was, heeft de COGEM geen advies uitgebracht over de pathogeniteitsklasse van *L. innocua*.

In 2000 heeft de COGEM advies uitgebracht over kloneringswerkzaamheden van gekarakteriseerde *L. monocytogenes* sequenties in *E. coli*.²⁰ Zij adviseerde deze in te schalen op ML-I inperkingsniveau. Tevens adviseerde zij werkzaamheden met *L. monocytogenes* mutanten onder ML-II inperkingsniveau uit te voeren met het aanvullende advies zwangere vrouwen van de werkzaamheden uit te sluiten.

Voorgenomen werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *L. innocua*

Bacteriofagen zijn virussen met bacteriën als gastheer. Bij het opkweken van bacteriofagen in onderhavige aanvraag, zal als gastheerorganisme een mutant van wild type *L. innocua* WSLC2627 gebruikt worden. In mutant WSLC2627 Δ *flaA* is het flagelline operon slechts ten dele aanwezig waardoor zijn flagel ontbreekt. Volgens de aanvrager beschikt het ggo daardoor over een gereduceerde fitness omdat wegens de verminderde beweeglijkheid zijn chemotaxis is afgenomen. Tevens kan het ggo zich minder goed aan zijn voedingsbron hechten.

De bacteriofaag die gekweekt zal worden ('P100'), behoort tot de virusfamilie Myoviridae en staat bekend als een lytische faag specifiek van *Listeria* soorten.²¹ De faag is geïsoleerd uit rioolwater.²² Een lytische faag vernietigt als onderdeel van zijn levenscyclus zijn gastheercel zonder in het genoom te integreren. Bioinformatische analyse van het genoom van P100 heeft aangetoond dat er geen sequenties aanwezig zijn die overeenkomst vertonen met genen, eiwitten of andere factoren die bekend zijn, of waarvan verondersteld wordt, dat ze een directe of indirecte rol spelen in de pathogeniteit of virulentie van *L. innocua* en andere micro-organismen.^{22,21} De bacteriofaag heeft in 2006 van de Food & Drug Administration (FDA) van de Verenigde Staten de GRAS status ('Generally Recognized as Safe') verkregen.²³

Deletiemutant WSLC2627 Δ *flaA* zal tot een bepaalde dichtheid opgekweekt worden in zes kweekzakken met ieder een maximaal volume van 50 liter. Vervolgens vindt infectie met de bacteriofaag plaats en wordt de incubatie vervolgd. De incubatiebakken zijn voorzien van opvangcontainers waarin, in geval van breuk, de inhoud van de zakken opgevangen wordt. Na incubatie zullen de bacteriofagen door middel van filtratie uit de kweek geïsoleerd worden. De aanvrager geeft aan dat, door de lytische eigenschappen van de faag en het filtratieproces, geen levend WSLC2627 Δ *flaA* in het faagfiltraat aanwezig zal zijn. Er worden geen experimentele gegevens aangeleverd die dit bevestigen.

Overweging en advies

Classificatie L. innocua

L. innocua is alom in het milieu aanwezig en vertegenwoordigt een onschadelijke, saprofytische, niet-hemolytische *Listeria* soort. *L. innocua* beschikt niet over virulentiegenen of -genclusters die beschreven zijn voor de pathogene *Listeria* soorten *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*.

Voor zover bij de COGEM bekend is tot nog toe in de literatuur slechts één maal een infectie gerapporteerd, veroorzaakt door een atypische, hemolytische *L. innocua* stam. Deze patiënt was behandeld met corticosteroïden.¹⁴ Er zijn incidenteel atypische, hemolytische *L. innocua* stammen beschreven die in het bezit zijn van enkele functionele virulentiegenen.¹⁷

De COGEM is van mening dat de atypische, hemolytische *L. innocua* varianten beschouwd kunnen worden als opportunistische pathogenen. Deze atypische stammen kunnen mogelijk bij immuungecompromitteerden ziekte veroorzaken en weerspiegelen de natuurlijke variabiliteit binnen de avirulente soort *L. innocua*. Samengevat is de COGEM van mening dat *L. innocua* niet pathogeen is. Zij adviseert de bacterie te classificeren als een klasse 1 pathogeen en acht de opname van de bacterie in Bijlage 1 van de Regeling ggo gerechtvaardigd.

Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerde L. innocua

De werkzaamheden bestaan uit het opkweken van lytische *Listeria* bacteriofagen in de flagelline-deficiënte *L. innocua* deletiemutant WSLC2627 Δ *flaA*. De COGEM is het eens met het argument van de aanvrager dat door de afwezigheid van de flagel de deletiemutant een verminderde fitness bezit in vergelijking met wildtype *L. innocua*. De gekweekte bacteriofaag bezit geen genen coderend voor de *L. monocytogenes* of *L. ivanovii* kenmerkende virulentiefactoren en zal tijdens

het kweekproces de bacteriële cellen vernietigen. De COGEM is van mening dat de voorgestelde werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden onder ML-I inperkingsniveau. Onder dit inperkingsniveau acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De aanvrager geeft aan de bacteriofagen te willen kweken om onderzoek te doen. Hij stelt dat na de kweek en filtratie geen levend ggo in het bacteriofaagfiltraat aanwezig zal zijn. De COGEM wijst erop dat indien de voorgenomen werkzaamheden ingezet zullen worden voor productie-doeleinden, aan de hand van een gevalideerde methode bevestigd moet worden dat er daadwerkelijk geen levend ggo in het faagfiltraat aanwezig is.

Referenties

1. Microeos B.V. <http://microeos.com/> (maart 2012)
2. Vazquez-Boland JA *et al.* (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14(3): 584-640
3. Hain T *et al.* (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. J of Biotechnol 126: 37-51
4. Dortet L *et al.* (2009). *Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds. Moselio Schaechter M *et al.* Academic Press, Oxford. Volume 2: 182-198
5. Gorski L *et al.* (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. Appl Environ Microbiol 69(1): 258-266
6. Gorski L *et al.* (2009). The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the food borne pathogen *Listeria monocytogenes*. PLoS ONE 4(4) e5142
7. Lemon KP *et al.* (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. J Bacteriol 189(12): 4418-4424
8. Caly D *et al.* (2009). Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. Letters in Applied Microbiology 49: 751-756
9. Buchrieser C *et al.* (2011). Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. J Bacteriol 193(23): 6787-6788
10. Schmid MW *et al.* (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. Systematic and applied Microbiology 28: 1-18
11. Todd ECD & Notermans S (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control 22: 1484-90
12. Swaminathan B & Gerner-Smidt P (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect 9(10): 1236-43
13. Drevets DA & Bronze MS (2008). *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. FEMS Immunol Med Microbiol 53(2): 151-65
14. Perrin M *et al.* (2003). Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. J Clin Micro 41(11): 5308-5309
15. Glaser P *et al.* (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. Science 294: 849-852

16. Buchrieser C (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes and Infection* 9: 1147-1155
17. Volokhov DV *et al.* (2007). The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73(6): 1928-1939
18. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
19. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
20. COGEM (2000). Advies kennisgeving GGO 00-205 getiteld 'Identificatie van transportsystemen en andere stressgerelateerde genen in *Listeria monocytogenes*'. COGEM advies CGM/001211-01
21. Hagens S & Loessner MJ (2007). Bacteriophages of *Listeria*. In: *Listeria monocytogenes*. Pathogenesis and host response. Eds Goldfine H & Shen H. Springer, U.S.A.
22. GRAS Exemption Claim of Listex™ P100 Bacteriophage (2006).
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/612853A.PDF (maart 2012)
23. Agency Response Letter Grass Notice No. GRN 000198 (2006). Bacteriophage P100 preparation from *Listeria innocua*.
<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154675.htm> (maart 2012)