

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 26 augustus 2013
KENMERK CGM/130826-01
ONDERWERP Advies “classificatie van de darmbacteriën *Akkermansia muciniphila* en *Faecalibacterium prausnitzii*”

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een aanvraag tot wijziging van de vergunning “Identificatie van factoren sturend in het fenotype en genexpressie van mammalia cellen -inclusief immuuncellen- betrokken bij differentiatie programma’s en oncologische transformatie” (IG 12-095) van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om de bacteriën *Akkermansia muciniphila* en *Faecalibacterium prausnitzii* te classificeren.

A. muciniphila en *F. prausnitzii* zijn bacteriën die in het maagdarmkanaal van de mens voorkomen en bij gezonde mensen een groot deel van de normale darmflora uitmaken. Er zijn geen aanwijzingen dat *A. muciniphila* of *F. prausnitzii* ziekteverwekkend zijn. De genomesequenties van beide bacteriesoorten zijn bekend. Er zijn geen aanwijzingen dat *A. muciniphila* of *F. prausnitzii* bekende toxinen of andere schadelijke genproducten kunnen produceren.

De COGEM adviseert om *A. muciniphila* en *F. prausnitzii* in te schalen als klasse 1 pathogeen en op Bijlage 1 te plaatsen. Conform de pathogeniteitsklasse van deze bacteriën kunnen werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau plaatsvinden.

Classificatie van de darmbacteriën *Akkermansia muciniphila* en *Faecalibacterium prausnitzii*

COGEM advies CGM/130826-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriën *Akkermansia muciniphila* en *Faecalibacterium prausnitzii*. De adviesvraag heeft betrekking op de aanvraag tot wijziging van de vergunning “Identificatie van factoren sturend in het fenotype en genexpressie van mammalia cellen –inclusief immuuncellen- betrokken bij differentiatie programma’s en oncologische transformatie” (IG 12-095) van het Erasmus Universitair Medisch Centrum.

De aanvrager wil uit zoogdieren diverse genen coderend voor transcriptiefactoren, morfogenen, signaleringselementen, stollingsfactoren en ontstekingsmediatoren isoleren en kloneren in *A. muciniphila* en *F. prausnitzii*. Het doel hiervan is o.a. om te onderzoeken of deze bacteriesoorten geschikt zijn als vector voor de productie in de darm van therapeutische eiwitten voor het darmslijmvlies. De aanvrager stelt voor om beide bacteriën in te schalen in pathogeniteitsklasse 1 en op Bijlage 1 van de Regeling ggo te plaatsen, zodat werkzaamheden met deze bacteriën op ML-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden.

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door niet pathogene (apathogene) micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.

Volgens de Regeling ggo is een indeling in pathogeniteitsklasse 1 van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van 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.¹

Bijlage 1 Regeling ggo

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant (pathogeniteitsklasse 1). 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.¹ Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren, virale en cellulaire oncogenen, en genen waarvan de expressie leidt tot verstoring van de ecologische balans in de darmflora.

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 en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

2. *Akkermansia muciniphila*

A. muciniphila is een anaerobe, gram-negatieve bacterie die behoort tot subdivisie 1 van de *Verrucomicrobia* (orde *Verrucomicrobiales*, klasse *Verrucomicrobiae*, divisie *Verrucomicrobia*). De bacterie werd in 2004 voor het eerst geïsoleerd uit de faeces van een gezonde persoon.² Sindsdien zijn *A. muciniphila* en hieraan verwante bacteriën aangetroffen in de darmen van verschillende zoogdieren. Ook in de darmen van kip, zebra-vis en Birmese python zijn bacteriën aangetroffen die verwant zijn aan *A. muciniphila*.³

A. muciniphila is een slijm afbrekende bacterie die in de slijmlaag van het maagdarmkanaal wordt aangetroffen. Uit onderzoek met gezonde mensen blijkt dat *A. muciniphila* het maagdarmkanaal in het eerste levensjaar koloniseert.⁴ *A. muciniphila* kan in gezonde volwassenen 3-5% van de microflora (microbial community) van het maagdarmkanaal uitmaken en is daar één van de dominante bacteriesoorten.⁴ De genomsequentie van *A. muciniphila* is bekend en geanalyseerd. Er zijn geen aanwijzingen dat *A. muciniphila* bekende toxinen of andere schadelijke genproducten kan produceren.⁵

Volgens sommige onderzoekers is de aanwezigheid van *A. muciniphila* in de slijmlaag cruciaal voor de juiste balans in de aanmaak en afbraak van de slijmlaag van het maagdarmkanaal en draagt de aanwezigheid van *A. muciniphila* daardoor bij aan de bescherming tegen indringers.³ Mogelijk heeft *A. muciniphila* ook een ontstekingsremmende rol. Aanwijzingen hiervoor zijn dat de aanwezigheid van *A. muciniphila* is verminderd bij patiënten met het prikkelbaredarmsyndroom⁷ en inflammatoire darmziekten, zoals de ziekte van Crohn.⁶ Bij patiënten met darmkanker wordt daarentegen een hoger percentage *A. muciniphila* aangetroffen. De onderzoekers verklaren dit doordat bij patiënten met darmkanker de productie van twee typen mucines (eiwitten die een bestanddeel zijn van het slijm van de slijmlaag) is verhoogd waardoor meer voeding aanwezig is voor *A. muciniphila*.⁷

A. muciniphila is een onderdeel van de normale microflora in het maagdarmkanaal.⁴ Er zijn voor zover de COGEM bekend geen aanwijzingen dat *A. muciniphila* ziekteverwekkend is.

2.1 Eerder COGEM advies en classificaties

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.^{8,9} *A. muciniphila* is echter nog niet door de COGEM geïdentificeerd. Ook zijn er geen andere soorten die tot het genus *Akkermansia* behoren door de COGEM geïdentificeerd. Het genus *Verrucomicrobium*, dat tot dezelfde orde behoort, werd geïdentificeerd als klasse 1 pathogeen.¹⁷

Door de Duitse ARBO instantie en de American Type Culture Collection wordt *A. muciniphila* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{22,10}

2.2 Overweging en advies

A. muciniphila is een bacterie die in de slijmlaag van het maagdkanaal voorkomt. Deze bacterie is één van de dominante bacteriën in het maagdkanaal van gezonde mensen. In het genoom van *A. muciniphila* zijn geen aanwijzingen gevonden dat de bacterie bekende toxinen of andere schadelijke genproducten kan produceren.

Gezien het bovenstaande beschouwt de COGEM *A. muciniphila* als apathogeen. De COGEM adviseert *A. muciniphila* in te schalen als klasse 1 pathogeen en op Bijlage 1 te plaatsen. Werkzaamheden met *A. muciniphila* kunnen conform de pathogeniteitsklasse op ML-I inperkingsniveau plaatsvinden.

3. *Faecalibacterium prausnitzii*

Faecalibacterium prausnitzii is een extreem zuurstof gevoelige, strikt anaerobe, gram-negatieve bacterie, die behoort tot Clostridium cluster IV (de *Clostridium leptum* groep) (familie Ruminococcaceae, klasse *Clostridia*, phylum *Firmicutes*). *F. prausnitzii* werd vroeger ingedeeld in het genus *Fusobacterium* en was toen bekend onder de naam *Fusobacterium prausnitzii*. Na sequentie-analyse bleek *F. prausnitzii* echter slechts een verre verwant van de andere *Fusobacteria* en werd vastgesteld dat *F. prausnitzii* meer verwant is aan de bacteriesoorten die behoren tot het Clostridium cluster IV. In 2002 is daarom besloten om de naam te wijzigen in *Faecalibacterium prausnitzii*.¹¹

F. prausnitzii is een van de meest aanwezige bacteriën in een gezonde menselijke darm en kan meer dan 5% van de daar aanwezige microbiële samenleving uitmaken. *F. prausnitzii* wordt niet aangetroffen in baby's onder de 6 maanden, maar koloniseert de darmen vrij snel erna.¹² Bij kinderen van 1 à 2 jaar oud beslaat *F. prausnitzii* al een substantieel deel van de microbiota in het maagdkanaal.¹² *F. prausnitzii* wordt niet alleen aangetroffen in het maagdkanaal van de mens, maar ook in dat van verschillende dieren (varken, muis, koe, gevoelste, kakkerlak).¹³ De genomsequentie van *F. prausnitzii* is bekend en hierin zijn geen bekende toxinen of andere schadelijke sequenties aanwezig.¹⁴

Er zijn aanwijzingen dat deze bacterie bij de mens gunstige effecten heeft op de gezondheid van de darm. Zo heeft *F. prausnitzii* ontstekingsremmende eigenschappen en produceert de bacterie butyraat waarvan verschillende gunstige effecten op de gezondheid zijn beschreven. *F. prausnitzii* is bij verschillende inflammatoire darmziekten, zoals de ziekte van Crohn en bij patiënten met een subtype van het prikkelbaredarmsyndroom verminderd aanwezig. Bij colitis ulcerosa patiënten werd echter wel een hoog aantal *F. prausnitzii* aangetroffen.¹³

Uit diverse publicaties blijkt dat *F. prausnitzii* onderdeel uitmaakt van de normale microflora in het maagdarmkanaal.^{12,15,16} Er zijn voor zover de COGEM bekend geen aanwijzingen dat *F. prausnitzii* ziekteverwekkend is.

3.1 Eerder COGEM advies en classificaties

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.^{17,18} *F. prausnitzii* is door de COGEM als klasse 2 pathogeen geïdentificeerd.¹⁸ *F. prausnitzii* komt in de lijst met pathogene bacteriën zowel voor onder de nieuwe naam *Faecalibacterium prausnitzii* als onder de oude naam *Fusobacterium prausnitzii*. Alle in de lijst genoemde *Fusobacterium* soorten zijn door de COGEM als klasse 2 pathogeen geïdentificeerd.¹⁸ In de lijst worden geen andere soorten genoemd die tot het genus *Faecalibacterium* behoren.

De classificatie van de bacteriën is gebaseerd op het onderzoeksrapport “Classification of bacterial pathogens”,¹⁹ dat in opdracht van de COGEM is geschreven. In dit onderzoek zijn tien verschillende (inter-) nationale lijsten met classificaties van humaan- en dierpathogene bacteriën met elkaar vergeleken. *F. prausnitzii* komt in een aantal internationale lijsten voor. In de Zwitserse lijst worden *Fusobacterium prausnitzii* en vrijwel alle andere *Fusobacterium* soorten in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.²⁰ In de Engelse lijst wordt het hele genus *Fusobacterium* in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld, maar *F. prausnitzii* wordt niet met name genoemd.²¹ In de Duitse lijst wordt *F. prausnitzii* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²² In deze lijst wordt naast de nieuwe naam ook de oude naam vermeld. Vrijwel alle soorten die tot het genus *Fusobacterium* behoren zijn in de Duitse lijst ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²²

Gezien het bovenstaande kan worden geconcludeerd dat het eerdere COGEM advies om *F. prausnitzii* als klasse 2 pathogeen te beschouwen een gevolg is van de vroegere indeling van *F. prausnitzii* in het genus *Fusobacterium*. In dit genus komen verschillende pathogenen voor.²³

Door de American Type Culture Collection wordt *Faecalibacterium prausnitzii* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.²⁴

3.2 Overweging en advies

De COGEM heeft *F. prausnitzii* eerder ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Dit was een gevolg van de vroegere indeling van *F. prausnitzii* in het genus *Fusobacterium* dat verschillende pathogene bacteriën bevat. Inmiddels is echter duidelijk dat *F. prausnitzii* slechts een verre verwant is van de bacteriesoorten in dit genus.

F. prausnitzii is een bacterie die in het maagdarmkanaal voorkomt. Deze bacterie is één van de dominante bacteriën in het maagdarmkanaal van gezonde mensen. In het genoom van *F. prausnitzii* zijn geen aanwijzingen gevonden dat de bacterie bekende toxinen of andere schadelijke genproducten kan produceren.

Gezien het bovenstaande herzielt de COGEM haar eerdere classificatie en merkt zij *F. prausnitzii* aan als apathogene bacterie. De COGEM adviseert *F. prausnitzii* in te schalen als klasse 1 pathogeen en op Bijlage 1 te plaatsen. Werkzaamheden met *F. prausnitzii* kunnen conform de pathogeniteitsklasse op ML-I inperkingsniveau plaatsvinden.

4. Conclusie

De COGEM beschouwt zowel *A. muciniphila* als *F. prausnitzii* als apathogeen. De COGEM adviseert om beide bacteriesoorten in te schalen als klasse 1 pathogeen en op Bijlage 1 te plaatsen. Werkzaamheden met *A. muciniphila* en *F. prausnitzii* kunnen conform de pathogeniteitsklasse op ML-I inperkingsniveau plaatsvinden.

5. Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. Derrien M *et al.* (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1469-1476
3. Belzer C & de Vos WM (2012). Microbes inside – from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J.* 6(8): 1449-1458
4. Collado, MC *et al.* (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol.* 73(23): 7767-7770
5. Van Passel *et al.* (2011). The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS one* 6(3): e16876. doi: 10.1371/journal.phone.0016876
6. Png CW *et al.* (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol.* 105: 2420-2428
7. Weir TL *et al.* (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS one* 8(8): e70803. doi: 10.1371/journal.phone.0070803
8. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
9. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
10. American Type Culture Collection – *Akkermansia muciniphila* – www.lgcstandards.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cAkkermansia+muciniphila%7c3%7c.Ny:True.Ro:0.N:1000552&searchTerms=Akkermansia+muciniphila&redir=1 (accessed August, 18th, 2013)
11. Duncan SH *et al.* (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 2141-2146
12. Hopkins MJ *et al.* (2005). Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 77-85
13. Miquel *et al.* (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.* 16: 1-7
14. The Genome Institute – Genome: *Faecalibacterium prausnitzii*. Website: <http://genome.wustl.edu/genomes/detail/faecalibacterium-prausnitzii-m21-2/>
15. Suau *et al.* (2001). *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *System Appl Microbiol.* 24: 139-145

16. Hold *et al.* (2003). Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 69(7): 4320-4324
17. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
18. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
19. Van Belkum (2011). Classification of bacterial pathogens. COGEM research report CGM 2011-07
20. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (2003) Richtlinien – Einstufung von Organismen - Bakterien
21. Advisory Committee on Dangerous Pathogens (2013). Health and safety executive. The approved list of biological agents.
22. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (2010)– Einstufung von Bakterien in Risikogruppen – TRBA 466. Edition: december 2010
23. Citron DM (2002). Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. *Clin Infect Dis.* 35 (suppl 1): S22-S27.
24. American Type Culture Collection – *Faecalibacterium prausnitzii* - http://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cfusobacterium+prausnitzii%7c3%7c.Ny:True.Ro:0.N:1000552&searchTerms=fusobacterium+prausnitzii&redir=1 (accessed August, 18th, 2013)