

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 21 januari 2014
KENMERK CGM/140121-01
ONDERWERP Advies 'Pathogeniteitsclassificatie mycotoxineproducerende schimmels'

Geachte mevrouw Mansveld,

COGEM en Bureau GGO hebben een onderzoek laten uitvoeren naar welke factoren van belang zijn bij de pathogeniteitsclassificatie van mycotoxine producerende schimmels. De COGEM komt op grond van het onderzoeksrapport tot het volgende advies.

Samenvatting:

In de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) worden (micro-)organismen ingedeeld in pathogeniteitsklassen. Deze indeling is van direct belang voor de inschaling van werkzaamheden met ggo's. De productie van toxines is een belangrijke aanwijzing om (micro-)organismen in pathogeniteitsklasse 2 of hoger te plaatsen. Dit heeft als consequentie dat werkzaamheden met ggo's gebaseerd op toxine producerende organismen onder ML-II inperkingsniveau of hoger moeten plaatsvinden.

Schimmels zijn alomtegenwoordig in het milieu en mens, dier en plant worden er veelvuldig aan blootgesteld. De meeste schimmels zijn niet met een ziekte geassocieerd. Sommige schimmels worden toegepast in de voedselindustrie. Deze argumenten zouden pleiten voor een indeling in pathogeniteitsklasse 1. Anderzijds kunnen veel schimmels mycotoxines produceren, wat indeling in een hogere pathogeniteitsklasse zou rechtvaardigen.

Om inzicht te verkrijgen hoe het beste met dit dilemma omgegaan kan worden, hebben de COGEM en het Bureau GGO een literatuuronderzoek laten uitvoeren naar de kenmerken van mycotoxines. Op basis van het daaruit voortgekomen onderzoeksrapport (bijgevoegd) heeft de COGEM in haar advies de factoren benoemd die essentieel zijn voor het classificeren van schimmels. Deze factoren betreffen onder meer de condities waaronder mycotoxineproductie plaatsvindt, de blootstellingsroute van het gevoelige organisme, de aard en de ernst van het veroorzaakte ziektebeeld en de toxiciteitsgegevens. De risicobeoordeling met betrekking tot de mycotoxineproductie vindt vervolgens plaats door deze factoren tegen elkaar af te wegen.

Pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels

COGEM advies CGM/140121-01

1. Inleiding

In de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo) worden (micro-)organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1 die gevormd wordt door niet pathogene (micro-)organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene (micro-)organismen. De indeling op basis van pathogeniteitsklasse is van direct belang voor de inschaling van werkzaamheden met ggo's.

De productie van toxines (giftige stoffen) zijn een belangrijke aanwijzing om (micro-)organismen in pathogeniteitsklasse 2 of hoger te plaatsen. Dit heeft als consequentie dat werkzaamheden in laboratoria met ggo's gebaseerd op toxine producerende organismen, onder ML-II inperkingsniveau of hoger moeten plaatsvinden.

In 2011 heeft de COGEM op basis van een onderzoeksproject twee adviezen opgesteld waarin een groot aantal schimmelsoorten in pathogeniteitsklassen is ingedeeld.^{2,3} Een aantal schimmels bleek moeilijk te classificeren. Enerzijds zijn de betreffende schimmels alomtegenwoordig in het milieu en worden mensen, dieren en planten er veelvuldig aan blootgesteld. De schimmels zijn niet direct met een ziekte geassocieerd, en worden soms toegepast in de voedselindustrie. Dit zou indeling in pathogeniteitsklasse 1 rechtvaardigen. Anderzijds kunnen dergelijke schimmels toxische metabolieten - waaronder mycotoxines - produceren, wat indeling in een hogere pathogeniteitsklasse zou rechtvaardigen.⁴ De toxineproductie vindt echter alleen plaats onder specifieke omstandigheden. Voorbeelden hiervan zijn *Penicillium roqueforti* en *Penicillium camemberti* die gebruikt worden bij de productie van zachte kaassoorten. Onder specifieke condities produceren deze schimmels onder meer de mycotoxines citrinine, patuline, penicillinezuur en roquefortine.^{5,6}

Om inzicht te verkrijgen hoe het beste met dit dilemma omgegaan kan worden, hebben COGEM en Bureau GGO een onderzoeksproject laten uitvoeren naar de kenmerken van mycotoxines. Het project is uitgevoerd door dr. C. Waalwijk van Plant Research International (Wageningen) en dr. ir. W.C.M. de Nijs van het RIKILT Institute for Food Safety (Wageningen). Het onderzoek heeft geresulteerd in een rapport getiteld '*Mycotoxins and assessment of environmental risks in laboratory conditions in The Netherlands*' (zie bijlage).

Op basis van het onderzoeksrapport heeft de COGEM in het onderhavige advies de factoren op een rij gezet die van belang zijn voor de pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmelsoorten.

2. Inhoud van het onderzoeksrapport in het kort

Op basis van literatuuronderzoek geven de uitvoerders een overzicht van de belangrijkste mycotoxines en hun fysische, chemische, biologische en toxische eigenschappen.⁷ Enkele complexe metabolische routes die ten grondslag liggen aan de regulatie en productie van mycotoxines worden gepresenteerd en verschillende groeiomstandigheden die de synthese van mycotoxines beïnvloeden worden benoemd. In verschillende tabellen wordt weergegeven wat de meest voorkomende mycotoxines zijn (Appendix 1 en Appendix 3), welke schimmelgeslachten deze mycotoxines kunnen produceren (Appendix 3), wat de prikkels zijn die tot mycotoxinesynthese aanzetten (Appendix 4) en welk ziektebeeld ze veroorzaken (Appendix 3). De appendices laten zien dat bepaalde mycotoxines verschillende soorten ziektebeelden kunnen veroorzaken.

In een stappenplan wordt gepresenteerd hoe een risicoclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels uitgevoerd kan worden (Appendix 2). De onderzoekers benadrukken daarbij dat als uitgangspunt een correcte identificatie van de te beoordelen schimmelsoort essentieel is. Identificatie dient op basis van adequate moleculaire technieken, en morfologische en biologische eigenschappen plaats te vinden.

3. Classificaties volgens Regeling ggo

3.1 Pathogeniteitsclassificatie

Volgens de Regeling ggo¹ 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.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een (micro-)organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een (micro-)organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

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.

3.2 Toxineclassificatie

Volgens de Regeling ggo worden toxines in toxiciteitsklassen onderverdeeld.¹ Toxines van klasse T-1 (licht toxisch) zijn toxines met een LD50 (dosis die lethaal is voor 50% van de geteste proefdierpopulatie) voor vertebraten van 1 tot en met 100 microgram per kilogram lichaamsgewicht. Toxines van klasse T-2 (matig toxisch) zijn toxines met een LD50 voor vertebraten van 100 nanogram tot en met 1 microgram per kilogram lichaamsgewicht. Toxines van klasse T-3 (zeer toxisch) zijn toxines met een LD50 voor vertebraten van 100 nanogram of minder per kilogram lichaamsgewicht.

De inschaling van werkzaamheden met toxine producerende genen in associatie met ggo's wordt casusgewijs bepaald op basis van onder meer de eigenschappen van het toxine, gegevens over de donorsequentie en de pathogeniteitsklasse of eigenschappen van het gastheerorganisme.

4. Eerdere COGEM adviezen

4.1 Pathogeniteitsclassificatie schimmels

De COGEM heeft in 2011 de pathogeniteitsklasse van een groot aantal schimmelsoorten vastgesteld.^{2,3} Soorten die, voor zover bij de COGEM bekend, niet geassocieerd zijn met ziekte maar wel in staat zijn onder bepaalde omstandigheden mycotoxine(s) te produceren, zijn - met uitzondering van vijf soorten (*Aspergillus fischerianus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* en *Penicillium chrysogenum*) - niet in deze adviezen opgenomen.² Met betrekking tot de vijf genoemde schimmelsoorten heeft de COGEM de afgelopen jaren geadviseerd ze in pathogeniteitsklasse 1 op te nemen.^{8,9,10}

4.2 Toxineclassificatie

In 2005 heeft de COGEM geadviseerd de toxiciteitsclassificatie binnen Regeling ggo te herzien omdat deze classificatie moeilijk in de praktijk is toe te passen. In het advies zijn vier criteria opgesteld waarmee toxines in toxiciteitsklassen (TK) ingedeeld kunnen worden. Op grond van deze classificatie kan het inperkingsniveau van werkzaamheden met toxineproducerende genen(clusters) in associatie met ggo's bepaald worden.¹¹

Het eerste criterium stelt vast of een verbinding genotoxische (toxisch voor erfelijk materiaal) of carcinogene (kankerverwekkende) eigenschappen bezit. Dit gebeurt op basis van de wetenschappelijke literatuur en, wat betreft carcinogeniteit, op basis van de 'International Agency for Research on Cancer' (IARC) classificatie.¹² Het tweede criterium betreft het achterhalen van

een LD50. Is er een LD50 waarde bekend, dan bepaalt deze in welke TK-klasse het toxine terecht komt. Indien er voor geen enkel diermodel een LD50 van het toxine bekend is, en er is niets bekend over genotoxische en carcinogene eigenschappen, dan kunnen als derde criterium gegevens over de letale dosis (LD100, dosis is lethaal bij 100% van de geteste proefdierpopulatie) bijdragen aan het bepalen van een toxiciteitsklasse. Het vierde criterium heeft betrekking op aanwijzingen in de wetenschappelijke literatuur over andere toxische eigenschappen van een genproduct, zoals het optreden van irreversibele effecten of de aanwezigheid van een relevante gelijkenis met een bekend toxine-gen of -genencluster.

De COGEM heeft geadviseerd om de regeling aan te passen en twee toxiciteitsklassen in te stellen: TK-1 (licht tot matig toxisch) en TK-2 (zeer toxisch). In het advies is een stroomschema opgenomen aan de hand waarvan de TK-klasse afgeleid kan worden. Aan de hand van de TK-klasse kunnen werkzaamheden met toxine coderende genen(clusters) in associatie met ggo's worden ingeschaald. Werkzaamheden met een TK-1 gen(encluster) worden geadviseerd onder ML-II- inperkingsniveau te laten plaatsvinden, werkzaamheden met een TK-2 gen(encluster) worden geadviseerd onder ML-III inperkingsniveau te laten plaatsvinden.

Het advies benoemt specifiek de problematiek van toxische metabolieten van schimmels. Enerzijds is de LD50 van bekende mycotoxines hoger dan 100 µg/ kg, waardoor deze buiten de gedefinieerde toxiciteitsklassen zouden vallen. Anderzijds zijn sommige mycotoxines bij langdurige of herhaalde blootstelling carcinogeen. Dit dilemma wordt in het advies ondervangen door te stellen dat genen(clusters) coderend voor toxines en secundaire metabolieten met genotoxische of carcinogene eigenschappen, ingedeeld dienen te worden in toxiciteitsklasse TK-2.

5. Adviezen andere beoordelende instanties

De 'European Food Safety Authority' (EFSA) heeft een aantal micro-organismen die toegepast worden in de voedselindustrie, onderworpen aan een veiligheidsbeoordeling. Indien er voor een dergelijk micro-organisme geen enkele aanleiding bestond om deze als onveilig te beschouwen, werd hieraan de 'Qualified Presumption of Safety' (QPS) status toegekend. De commissie concludeerde dat in het geval van filamenteuze schimmels, een bekende historie van veilig gebruik altijd gekoppeld was aan een specifieke toepassing van de betreffende schimmelsoort, en niet toegekend kon worden aan de schimmelsoort in zijn geheel. Zij heeft daarom aan geen enkele filamenteuze schimmelsoort de QPS status toegekend.¹³

In 2011 heeft de EFSA opnieuw verschillende schimmels beoordeeld. Zij kwam tot de conclusie dat door de onnauwkeurigheden en inconsistenties in de schimmel-identificatie, de onvoldoende kennis met betrekking tot regulatiemechanismen onderliggend aan mycotoxineproductie, en het feit dat er steeds meer nieuwe mycotoxines ontdekt worden, aan geen enkele filamenteuze schimmelsoort de QPS status toegekend kon worden.¹⁴

De 'United States Food and Drug Administration' (US FDA) heeft aan bepaalde schimmels en schimmelfermentatieprocedures, die toegepast worden in de biotechnologie industrie, de 'generally regarded as safe' (GRAS) status toegekend.¹⁵ Aan deze GRAS toekenning is de voorwaarde

verbonden dat niet-pathogene en niet-toxigene stammen worden gebruikt, en dat het industriële fermentatieproces plaatsvindt onder 'Good Manufacturing Practice' condities.

6. Mycotoxines: definitie en kenmerken

Het begrip toxine is gedefinieerd als een natuurlijk geproduceerde stof die giftig is voor andere organismen. Toxines kunnen eiwitten zijn, direct geproduceerd door tot expressie gebrachte genen. Toxines kunnen ook indirect via (complexe) chemische reacties tijdens de stofwisseling geproduceerd worden (metabolieten). Mycotoxines zijn gedefinieerd als door schimmels geproduceerde metabolieten die giftig zijn voor mens en dier. Metabolieten alléén toxisch voor planten of micro-organismen vallen niet onder het begrip mycotoxine. Ook metabolieten met een laag molecuulgewicht die in hoge concentraties toxisch zijn (zoals ethanol) worden niet tot de mycotoxines gerekend.^{6,16}

6.1 Mycotoxines zijn secundaire metabolieten en worden onder specifieke condities geproduceerd

In tegenstelling tot metabolieten die geproduceerd worden tijdens de voor groei, ontwikkeling en reproductie noodzakelijke primaire stofwisseling, worden mycotoxines aangemaakt op het moment dat de schimmel daartoe specifiek geprikkeld wordt, bijvoorbeeld onder stressvolle omstandigheden.^{16,17,18} Sommige schimmelsoorten produceren daarbij meer dan één mycotoxine (zie kader). Tijdens de suboptimale condities gaat de schimmel over op zijn secundaire metabolisme. Factoren die hierbij een rol spelen zijn onder meer zuurgraad, vochtigheid, atmosferische druk, lichtintensiteit, temperatuur en beschikbaarheid van voedingsstoffen.^{16,17} Het secundaire metabolisme kost de schimmel meer energie dan het primaire metabolisme.¹⁶

Schimmelsoorten en mycotoxines

Sommige schimmelsoorten produceren verscheidene mycotoxines. *Aspergillus niger* kan bijvoorbeeld de fumonisines B2 en B4, en ochratoxine A produceren.²⁵ *Penicillium camemberti* kan citrinine en roquefortine produceren.⁷ De belangrijkste schimmelgeslachten die mycotoxines produceren zijn *Aspergillus* (onder meer aflatoxines, ergotamines, fumonisines, citrinine, ochratoxine A, patuline, sterigmatocystine), *Fusarium* (fumonisines, trichotecenen, zearalenone groep, beauvericine, moniliformine), *Penicillium* (citrinine, ochratoxine A, patuline, roquefortine C), *Claviceps* (ergotamines) en *Alternaria* (alternaria toxines, fumonisines).^{6,7,20}

6.2 Bij de synthese van mycotoxines zijn veel genen betrokken

De synthese van mycotoxines vindt plaats via verschillende stofwisselingsroutes waarbij complexe reacties en veel enzymen betrokken zijn. De genen die voor deze enzymen coderen zijn in geclusterde vorm in het schimmelgenoom aanwezig. De genenclusters zijn enkele tientallen kilobasen groot, liggen naast elkaar en worden in onderlinge samenhang gereguleerd.^{7,17} Schimmel regulatorenengen kennen verschillende hiërarchische niveaus. Sommige transcriptiefactoren beïnvloeden alleen de expressie binnen hun eigen genencluster. Andere regulatoren beïnvloeden daarnaast ook fysiologische processen gecodeerd door andere genenclusters.^{7,18} Voor veel mycotoxines zijn de biochemische stofwisselingsroutes nog niet opgehelderd of is nog niet bekend

welke genenclusters erbij betrokken zijn. Soms zijn de stofwisselingsroutes en de betrokken genenclusters wel beschreven, maar is niet bekend onder welke condities mycotoxineproductie tot stand komt.⁷

6.3 Schadelijke effecten van mycotoxines zijn vaak pas na verloop van tijd merkbaar

Mycotoxines veroorzaken uiteenlopende ziektebeelden (zie kader). Voor de meeste mycotoxines geldt dat na blootstelling het schadelijk effect niet direct merkbaar is, maar pas op de lange termijn of na herhaalde blootstelling. Veelal is er geen LD50 bekend of is deze hoger dan 100 µg/kg. Van een beperkt aantal mycotoxines is bekend dat zij bij mens of dier een acuut toxisch effect hebben. Deze directe effecten uiten zich in de vorm van maag/darmklachten (aflatoxines, fumonisines, patuline) of ergotisme (ergotamine).^{19,20}

Mycotoxines en ziektebeelden

Veel voorkomende mycotoxines zijn de aflatoxines, de ergotamines, de fumonisines, de trichothecenen, de zearalenone groep, citrinine, ochratoxine A, patuline en sterigmatocystine.^{6,7,12} Indelingen in groepen zijn onder meer gebaseerd op de fysische eigenschappen, de chemische structuur, de aard van het ziektebeeld dat ze veroorzaken of het werkingsmechanisme van het toxine.^{6,17} Inmiddels zijn er honderden mycotoxines beschreven.^{6,7,16}

Sommige mycotoxines zijn kankerverwekkend (aflatoxines) of mogelijk kankerverwekkend (fumonisines, ochratoxine A, sterigmatocystine). Daarnaast kunnen mycotoxines schadelijk zijn voor het immuunsysteem (bepaalde trichothecenen, aflatoxines, fumonisines, ochratoxine A, patuline), de nieren (bepaalde trichothecenen, fumonisines, citrinine, ochratoxine A, patuline), de lever (aflatoxines, fumonisines, ochratoxine A), het zenuwstelsel (bepaalde trichothecenen, fumonisines), de ongeboren vrucht (aflatoxines, ergotamines, citrinine, ochratoxine A, sterigmatocystine), of kunnen ze vruchtbaarheidsproblemen veroorzaken wegens gelijkenis met het hormoon oestrogeen (zearalenone). Ergotamines veroorzaken ergotisme (Sint Antoniusvuur), een ziektebeeld dat zich uit in bloedvatvernauwing en leidt tot de afsterving van vingers en tenen (gangreen), en psychische stoornissen.

6.4 Mycotoxinevergiftiging vindt voornamelijk plaats via de consumptie van gecontamineerd voedsel

De belangrijkste route waarlangs mens of dier blootgesteld kunnen worden aan mycotoxines is door het eten van met schimmels besmet voedsel. Besmetting van bijvoorbeeld landbouwproducten vindt plaats doordat een mycotoxineproducerende schimmel pathogeen is voor een landbouwgewas (zoals *Claviceps purpurea* of 'moederkoren', dat graankorrels aantast en ergotamines produceert), of door een bewaarziekte. In het laatste geval is het landbouwproduct opgeslagen onder voor de schimmel gunstige groeiomstandigheden (zoals *Aspergillus flavus*, dat bij granen en noten onder vochtige omstandigheden aflatoxine B1 produceert).

Een andere blootstellingsroute is via de inhalatie van met mycotoxine besmet stof of van mycotoxine bevattende schimmelsporen en schimmeldraden. Bij een boer in Duitsland is ergotisme beschreven na werkzaamheden met *C. purpurea* besmet roggemeel.⁴ Ook is melding gemaakt van ochratoxine vergiftiging bij boerderijdieren door de aanwezigheid van ochratoxine A bevattende stofdeeltjes in stallen.⁶ Van sommige chemotypen van *Stachybotrys chartarum* is beschreven dat de sporen in de lucht een hoog gehalte aan trichothecenen kunnen bevatten.²¹

Een derde blootstellingsroute aan mycotoxines is via de huid en slijmvliezen. Vergiftiging via contact wordt zelden waargenomen maar is beschreven voor *Fusarium* soorten (type A trichothecenen).^{7,20}

7. Nomenclatuur en identificatie van schimmels

Bij het in kaart brengen of een bepaalde schimmelsoort mycotoxine(s) produceert, is het van belang om te weten onder welke naam de schimmel bekend is. De nomenclatuur van schimmels is complex en kan voor een buitenstaander tot verwarring leiden.

Het merendeel van de schimmels kan zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk reproduceren. Daarbij kennen de ongeslachtelijke (anamorfe) en geslachtelijke (teleomorfe) levensstadia hun eigen naamgeving die naast elkaar wordt gebruikt.²² Daarnaast kennen sommige anamorfe stadia ook weer verschillende verschijningsvormen (synanamorf). De soort *Pseudallescheria boydii* kent bijvoorbeeld ook de synanamorfe namen *Graphium eumorphum* en *Scedosporium apiospermium*. Deze drie namen refereren allen naar hetzelfde organisme.²³ De verwarring in de schimmel naamgeving wordt nog verder vergroot omdat soorten in een anamorf genus (bijvoorbeeld *Aspergillus*) tot verschillende teleomorfe genera kunnen behoren (*Eurotium*, *Emericella*, *Fennellia*, *Neosartorya* en *Petromyces*).²⁴ Daarnaast zijn door de ontwikkelingen in de sequentietechnologie complete genoomsequenties van schimmels ter beschikking gekomen. Hierdoor zijn, zoals bij veel micro-organismen, de taxonomische inzichten aan het veranderen en is de nomenclatuur van schimmels aan verandering onderhevig.^{7,24,25}

De identificatie van schimmels is niet eenvoudig. In de loop der jaren heeft de komst van nieuwe technieken tot een steeds nauwkeuriger en meer gestandaardiseerde identificatie van schimmelsoorten geleid (zie kader).⁷

Schimmel-identificatie

De identificatie van schimmels berust op drie concepten.⁷ Het eerste concept betreft de morfologische eigenschappen van onder meer sporen en kolonies op verschillende voedingsmedia, microscopische kenmerken en geur ('Morphological Species Concept', MSC). Identificatie op basis van dit concept vraagt om specialistisch opgeleid personeel. Het tweede concept berust op het feit of een populatie zich seksueel kan voortplanten met een andere populatie ('Biological Species Concept', BSC). Aangezien niet alle schimmels zich seksueel kunnen voortplanten, is dit concept slechts ten dele bruikbaar. Het derde concept berust op de sequentiegegevens van specifieke DNA fragmenten ('Phylogenetic Species Concept', PSC) en is relatief recent ontwikkeld. De sequenties van deze DNA-fragmenten ('loci') zijn samengebracht in databases en gekoppeld aan specifieke schimmelsoorten. De databases zijn beschikbaar in het publieke domein. Het PSC heeft tot een nauwkeuriger identificatie van schimmelsoorten geleid.

8. Overwegingen en advies

Indien een schimmelsoort of -stam in staat is mycotoxine te produceren, kan de ernst van het door het mycotoxine veroorzaakte schadelijke effect gecombineerd met de kans dat dit schadelijk effect daadwerkelijk optreedt, van invloed zijn op de pathogeniteitsclassificatie van de schimmel.

Schimmels kunnen onder specifieke omstandigheden mycotoxines produceren waarbij de ernst van het schadelijke effect meestal niet lineair gerelateerd is aan de geproduceerde hoeveelheid. De COGEM merkt op dat bij de risicobeoordeling voor werkzaamheden met schimmels in associatie met ggo's, voor zover het de productie van mycotoxines betreft, de volgende elementen van belang zijn:

1. Kan de schimmel mycotoxine(s) produceren? Zo ja, onder welke omstandigheden?
2. Wat is de blootstellingsroute waarlangs het schadelijk effect bereikt wordt?
3. Wat is het schadelijk effect?

Ad 1. Productie

Indien mycotoxineproductie onder gangbare milieumomstandigheden plaatsvindt, kunnen gevoelige organismen ermee in aanraking komen. Indien mycotoxineproductie onder kweekomstandigheden plaatsvindt, zoals in de laboratoriumsituatie, kan een betrokken medewerker ermee in aanraking komen. Beide situaties kunnen een overweging zijn om de betreffende schimmel in een hogere pathogeniteitsklasse in te delen. Het is daarom van belang om in kaart te brengen onder welke condities de productie plaatsvindt ten einde een afweging te kunnen maken hoe reëel de kans is dat mens of dier met het betreffende mycotoxine in aanraking komt. Omgevingscondities die in overweging genomen kunnen worden zijn onder meer zuurgraad, vochtigheid, atmosferische druk, lichtintensiteit, temperatuur en de beschikbaarheid van voedingsstoffen.

Tevens acht de COGEM het van belang dat er informatie verkregen wordt over de hoeveelheid mycotoxine(s) die een te classificeren schimmelsoort kan produceren. Indien eveneens bekend is bij welke dosis het schadelijke effect bereikt wordt (bijvoorbeeld een LD50 of LD100), kan aan de hand daarvan beoordeeld worden of de mycotoxineproductie relevant is voor de pathogeniteitsclassificatie.

Ad 2. Blootstellingsroute

De wijze waarop een gevoelig organisme met een mycotoxine in aanraking komt (de blootstellingsroute) is van invloed op de kans dat een schadelijk effect daadwerkelijk optreedt. Veel mycotoxines zijn alleen schadelijk via de orale route, na inname van - met schimmel of mycotoxine - gecontamineerd voedsel. Voor een dergelijk mycotoxine geldt dat de kans op het schadelijke effect minimaal is als het gevoelige organisme via inhalatie of door huidcontact met het mycotoxine in aanraking komt. Een dergelijk minimaal effect is representatief voor de laboratoriumsetting, waar eten of drinken niet toegestaan is.

Indien de schadelijke blootstellingsroute via de ademhalingswegen plaatsvindt, bijvoorbeeld via grote hoeveelheden schimmelsporen aanwezig in de lucht of via direct contact met de huid (laboratoriumhandelingen), zijn de risico's voor de medewerker in een laboratoriumsetting wel reëel aanwezig. In dat geval zullen aanvullende inperkende maatregelen genomen moeten worden, zoals het dragen van handschoenen of, indien open handelingen worden uitgevoerd waarbij schimmelsporen in de lucht terecht kunnen komen, het gebruiken van een veiligheidskabinet. De COGEM acht het daarom van belang dat in kaart gebracht wordt via welke blootstellingsroute een

mycotoxine schadelijk is. Indien dit de aerogene route betreft, wijst zij op het belang van het nemen van voldoende inperkende maatregelen tijdens het uitvoeren van werkzaamheden waarbij schimmelsporen vrij kunnen komen.

Ad 3. Schadelijk effect

De ernst van het schadelijk effect van een mycotoxine wordt bepaald door zijn toxiciteit en de aard en ernst van het veroorzaakte ziektebeeld. De COGEM wijst er op dat een schadelijk effect direct (acuut) of na verloop van tijd merkbaar kan zijn, bijvoorbeeld pas na langdurige of herhaalde blootstelling.

Elk van de hierboven beschreven elementen kunnen aan de hand van de wetenschappelijke literatuur en informatieve websites in kaart gebracht worden. Voor adressen van informatieve websites en beoordelende instanties (zoals EFSA, US FDA, IARC, Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit, Stichting Voedingscentrum Nederland, 'Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives'), verwijst de COGEM naar de onderstaande referentielijst, de 'Mycotoxins Factsheet' uitgegeven door het 'Joint Research Center' van de Europese Commissie, en bijgevoegd rapport.^{7,12,13,19,26,27,28} Ook de websites van de 'Council for Agricultural Science and Technology', de 'Mycotoxicology Newsletter', de 'Society for Mycotoxin Research' en de 'Japanese Association of Mycotoxicology' bevatten relevante en recente informatie over mycotoxines.^{29,30,31,32}

De COGEM wijst erop dat er zich de bijzondere situatie voor kan doen dat een schimmel onder gangbare milieuomstandigheden of tijdens specifieke technologische toepassingen (bijvoorbeeld in de voedselindustrie, waarbij de betreffende stam een GRAS status heeft) geen mycotoxine(s) produceert, maar tijdens kweekomstandigheden in het laboratorium wel. Indien het betreffende mycotoxine schadelijk is voor de mens, is het in dat geval noodzakelijk om de betreffende schimmel in een hogere pathogeniteitsklasse in te delen ten einde de veiligheid voor de betrokken medewerker(s) tijdens werkzaamheden te waarborgen.

Voor zover het de productie van mycotoxines betreft, is de COGEM van mening dat werkzaamheden met schimmels in associatie met ggo's vooral een risico voor de medewerkers met zich mee brengt. In de laboratoriumsetting is mycotineproductie niet van invloed op de mate van verspreiding van een schimmel naar het milieu.

Gezien de condities waaronder met schimmels in laboratoria wordt gewerkt (handelingen waarbij sporen kunnen vrij komen, worden uitgevoerd in een klasse 2 veiligheidskabinet), biedt - met betrekking tot mycotoxineproductie - het ML-III inperkingsniveau niet meer bescherming voor de individuele medewerker dan het ML-II inperkingsniveau. De COGEM is daarom van mening dat voor werkzaamheden met schimmels in associatie met ggo's, voor zover het mycotoxineproductie betreft, inschaling op ML-II niveau - al dan niet met aanvullende voorschriften - afdoende is.

9. Conclusie

De COGEM concludeert dat de risico's bij werkzaamheden met een mycotoxineproducerende schimmel door verschillende factoren worden bepaald die bij de pathogeniteitsclassificatie van de schimmel in het algemeen en de risicobeoordeling met betrekking tot het toxine in het bijzonder, tegen elkaar afgewogen dienen te worden. Ten behoeve van deze afwegingen acht zij het van belang dat de hieronder weergegeven elementen in kaart worden gebracht.

Relevante elementen ten behoeve van de pathogeniteitsclassificatie van mycotoxineproducerende schimmels:

Mycotoxineproductie

- Produceert de schimmelsoort mycotoxine(s)? Welke?
- Onder welke condities vindt mycotoxine productie plaats? (Onder meer zuurgraad, vochtigheid, atmosferische druk, lichtintensiteit, temperatuur, beschikbaarheid van voedingsstoffen)
- Welke hoeveelheden mycotoxine(s) worden geproduceerd?

Blootstellingsroute

- Wat is de blootstellingsroute van het mycotoxine?
 - Oraal? (minder relevant in laboratoriumsituatie)
 - Inhalering? (relevant in laboratoriumsituatie)
 - Contact? (relevant in laboratoriumsituatie)
- Is er mycotoxine in de sporen aanwezig? (indien sporenproductie)
- Welk organisme is gevoelig?

Schadelijk effect

- Wat is het schadelijk effect van het mycotoxine?
 - Aard en ernst ziektebeeld?
 - Toxiciteitsgegevens? (Zoals mate van toxiciteit, direct of indirect effect, dosis/effect relatie)

10. Signalering

De COGEM wijst erop dat de identificatie van schimmels niet eenvoudig is. Zij signaleert dat de schimmel-identificatie bij de vergunningaanvraag een punt van aandacht is ten einde een juiste inschaling van de werkzaamheden te kunnen waarborgen.

De COGEM wijst er verder op dat de schimmelnomenclatuur aan verandering onderhevig is geweest. Dit is een complicerende factor bij literatuuronderzoek naar relevante factoren voor de mycotoxineproductie en de inschaling van de betreffende schimmelsoort. Zij acht het een belangrijk punt van aandacht dat bij literatuuronderzoek alle verschillende namen waaronder de schimmel in de loop der jaren taxonomisch bekend was, worden meegenomen.

De COGEM wijst er daarnaast op dat wanneer er in laboratoriumsituaties mycotoxines geproduceerd worden, dit toxische stoffen betreffen waarop de gebruikelijke wetgeving inzake chemicaliën en chemisch afval van toepassing is.

Referenties

1. VROM 2004. Regeling genetisch gemodificeerde organismen. Versie geldend op 03/12/10.
<http://www.ggo-vergunningverlening.nl/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:193514&versionid=&subobjectname=>. Website bezoek 08/01/14
2. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
3. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
4. Büniger J *et al.* (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 202: 199-211
5. Erdogan A *et al.* (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *Int J Food Microbiol* 85: 83-85
6. Bennet JW & Klich M (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3): 497-516
7. Waalwijk C & de Nijs M (2013). Mycotoxins and assessment of environmental risks in laboratory conditions in The Netherlands. COGEM onderzoeksrapport CGM/2013-1
8. COGEM (1996). Advies kennisgeving GGO 96-032. COGEM advies CGM/960320-01
9. COGEM (2008). Classificatie van een vijftal schimmelsoorten. COGEM advies CGM/080131-05
10. COGEM (2010). Classificatie schimmelsoort *Neosartorya fischeri*. COGEM advies CGM/100407-01
11. COGEM (2005). Classificatie van toxine producerende genen. COGEM advies CGM/050628-01
12. Agents classified by the IARC monographs. International Agency for Research on Cancer.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Websitebezoek 30/09/2013
13. Scientific Committee EFSA (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* 587: 1-16
14. EFSA on Biological Hazards (2011). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA Journal* 9(12): 2497
15. Schuster E *et al.* (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 426-435
16. Boss M (2005). In: *Mold. Encyclopedia of toxicology* (2nd edition). Editor in chief Wexler, P
17. Khaldi N *et al.* (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* 47: 736-741
18. Fox EM & Howlett BJ (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion Microbiology* 11: 481-487
19. Stichting Voedingscentrum Nederland. Schimmelgiftstoffen. www.voedingscentrum.nl. Website bezoek 14/01/2014
20. Marin S *et al.* (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicity*. 60: 218-237
21. Pestka JJ *et al.* (2008). *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicological sciences* 104(1): 4-26
22. Hawksworth DL (2009). Separate name for fungus's sexual stage may cause confusion. *Nature* 458: 29
23. *Clinical Atlas of Fungi* 2003
24. Boekhout T. (2011). Classificatie humaan- en dierpathogene fungi. COGEM onderzoeksrapport CGM/2011-08
25. Nielsen KF *et al.* (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem* 395: 1225-1242

26. Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit (2008). Kennisblad algemeen mycotoxinen. <http://www.vwa.nl/actueel/bestanden/bestand/29349>. Website bezoek 14/01/2014
27. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2009). <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx?fc=52>. Website bezoek 18/12/13
28. Lerda D, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission (2011). Mycotoxins factsheet. 4th edition. JRC Technical Notes 66956. http://irmm.jrc.ec.europa.eu/EURLs/eurl_mycotoxins/Documents/Factsheet%20Mycotoxins.pdf. Website bezoek 14/01/2014
29. Council for Agricultural Science and Technology. <http://www.cast-science.org/publications/index.cfm?show=searchresults>. Website bezoek 19/12/2013
30. Mycotoxicology Newsletter. www.mycotoxicology.org. Website bezoek 19/12/2013
31. Society for Mycotoxin Research. www.mycotoxin.de. Website bezoek 19/12/2013
32. Japanese Association of Mycotoxicology. http://www.jsmyco.org/MYCONTENTS/Eng/eng_journal.html. Website bezoek 19/12/2013