

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

**DATUM** 05 september 2014  
**KENMERK** CGM/140905-01  
**ONDERWERP** Advies classificatie en inschaling werkzaamheden (gg-) *Candida maltosa*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 14-064/00 met de titel 'Ontwikkeling van bacteriële en eukaryote vetzuur-productiesystemen' deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Candida maltosa*. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *C. maltosa* ingeschaald dienen te worden, en is zij verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van *C. maltosa* in Bijlage 1 van de Regeling ggo. Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die 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 aanvrager is van plan genen betrokken bij de stofwisseling van de bacterie *Pseudomonas oleovorans* in het genoom van *C. maltosa* in te brengen. Deze bacterie is eerder door de COGEM geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.

Voor zover bij de COGEM bekend is *C. maltosa* nooit in verband gebracht met pathogeniteit bij mens, dier of plant. De gistsoort kent een lange historie van veilig gebruik. De COGEM acht daarom indeling van *C. maltosa* in pathogeniteitsklasse 1 en plaatsing in Bijlage 1 gerechtvaardigd. Vanwege het apathogene karakter van *C. maltosa* en *P. oleovorans* acht zij de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met gg-*C. maltosa* verwaarloosbaar klein. Derhalve adviseert zij deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

*C. maltosa* is onder verschillende namen bekend (*C. cloacae*, *C. novellus*, *C. subtropicalis*). De COGEM wijst op het belang dat de gistsoort onder zijn meest recente naamgeving (*C. maltosa*) op de betreffende lijsten van de Regeling ggo wordt opgenomen.



# Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Candida maltosa*

## COGEM advies CGM/140905-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de gistsoort *Candida maltosa* en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *C. maltosa*. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van *C. maltosa* op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo).

De vergunningsaanvraag is getiteld 'Ontwikkeling van bacteriële en eukaryote vetzuur-productiesystemen' en is aangevraagd door St. DLO Food & Biobased Research B.V. van Wageningen UR. De aanvrager heeft verzocht de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II inperkingsniveau.

### *C. maltosa*

In de wetenschappelijke literatuur is *C. maltosa* onder verschillende namen bekend.<sup>1,2,3,4</sup> Conform het meest recente overzicht van de classificatie van gisten door Kurtzman *et al.*,<sup>5</sup> worden voor *C. maltosa* de synoniemen *C. cloacae*, *C. novellus* en *C. subtropicalis* vermeld.

*C. maltosa* is alom in het milieu tegenwoordig.<sup>5,6,7</sup> Isolaten zijn onder meer uit bodem, lucht, grond en industrieel afvalwater verkregen. Van sommige isolaten is bekend dat zij zogenaamde 'killer'-activiteit tegen andere gistsoorten vertonen.<sup>5,7,8,9</sup> Deze eigenschap is een wijd verbreid fenomeen onder gisten.<sup>10</sup> Van andere isolaten is beschreven dat zij n-alkanen kunnen metaboliseren.<sup>5,11</sup>

In de wetenschappelijke literatuur is *C. maltosa* eenmaal beschreven als verwekker van uierontsteking bij een koe.<sup>12</sup> Echter, de identificatie van de gist was gebaseerd op een beperkt aantal fenotypische testen en de stam blijkt niet traceerbaar. *C. maltosa* is nauw verwant aan de pathogeen *C. tropicalis*.<sup>5,13,14,15,16</sup> In tegenstelling tot *C. tropicalis*, hebben infectieproeven in muizen met *C. maltosa* geen aanwijzingen voor pathogeniteit laten zien.<sup>17</sup>

Tot op heden is de genomsequentie van *C. maltosa* niet in het publieke domein gedeponerd.

### Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.<sup>18</sup> 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:

- 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.

Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen 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.<sup>18</sup> In de op handen zijnde nieuwe 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013' zal een aangepaste lijst van niet pathogene micro-organismen opgenomen worden (Lijst A1 onder Bijlage 2).<sup>19</sup>

#### **Eerdere COGEM adviezen en classificaties door andere beoordelende instanties**

In 2007 heeft de COGEM een onderzoeksproject laten uitvoeren naar de pathogeniteitsclassificatie van een groot aantal schimmelsoorten. Daarbij zijn lijsten van diverse beoordelende instanties uit het buitenland met elkaar vergeleken. Op grond van deze vergelijking en op basis van een beoordeling van experts heeft dit tot een rapport met pathogeniteitsclassificaties geleid. In haar adviezen uit 2011 over de classificatie van (a)pathogene schimmels heeft de COGEM zich gebaseerd op dit rapport en heeft zij verschillende *Candida* gistsoorten geclassificeerd als een klasse 1 dan wel klasse 2 pathogeen.<sup>20,21</sup> Zij heeft toen niet geadviseerd over de classificatie van *C. maltosa*.

Het 'CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre' heeft in haar collectie zes *C. maltosa* stammen in haar bezit, waaronder 'type strain' CBS 5611. Werkzaamheden met deze stammen zijn ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau BSL1.<sup>6</sup> De American Type Culture Collection (ATCC) heeft twee van deze zes stammen in haar bezit, en heeft werkzaamheden met deze gisten eveneens ingedeeld in het laagste veiligheidsniveau.<sup>22</sup>

#### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is van plan kloneringswerkzaamheden uit te voeren waarbij genen van *Pseudomonas oleovorans* die betrokken zijn bij het centrale en het secundaire metabolisme, in *Candida maltosa* ingebracht zullen worden. De bacterie *P. oleovorans* is eerder door de COGEM geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.<sup>23</sup>

## Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is van veel micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange gedocumenteerde historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijk anderszins moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel eveneens als niet pathogeen beschouwd.

Voor zover bij de COGEM bekend, is *C. maltosa* in de wetenschappelijke literatuur nooit in verband gebracht met pathogeniteit bij mens, dier of plant. In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, wordt *C. maltosa* (incl. synoniemen) niet vermeld.<sup>24</sup> In diverse studies naar verwekkers van invasieve *Candida* infecties bij mensen wordt eveneens geen melding gemaakt van *C. maltosa*.<sup>14,25</sup> Tijdens infectieproeven bij muizen die met *C. maltosa* waren geïnoculeerd, werden geen ziekteverschijnselen waargenomen.<sup>17</sup> *C. maltosa* is alom in het milieu tegenwoordig en wordt al meer dan 40 jaar bij werkzaamheden in laboratoria toegepast.

Op basis van bovenstaande eigenschappen concludeert de COGEM dat *C. maltosa* voldoet aan de criteria voor pathogeniteitsklasse 1. Zij acht daarom indeling van *C. maltosa* in de laagste pathogeniteitsklasse en plaatsing op Bijlage 1 gerechtvaardigd.

Vanwege het apathogene karakter van *C. maltosa* en *P. oleovorans* acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met gg-*C. maltosa* verwaarloosbaar klein. Derhalve adviseert zij deze werkzaamheden in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

*C. maltosa* is onder verschillende namen bekend: *C. cloacae*, *C. novellus*, *C. subtropicalis*. De COGEM wijst op het belang dat de gistsoort onder zijn meest recente naamgeving (*C. maltosa*) op de betreffende lijsten van de Regeling ggo wordt opgenomen.

## Signalering

De apathogene gistsoort *C. maltosa* is moeilijk te onderscheiden van de humaan- en dierpathogene *C. tropicalis*. De COGEM signaleert dat dit voor de uitvoerders van de voorgenomen experimenten een punt van aandacht is teneinde de veiligheid voor betrokken medewerkers en het milieu te kunnen waarborgen.

## Referenties

1. Kaneko T *et al.* (1977). Taxonomic studies on a hydrocarbon-assimilating *Candida* strain. *Agric Biol Chem* 41(111): 2269-2275
2. Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology: practical protocols. Eds Wolf K *et al.* (2003). Springer Science & Business media
3. Meyer SA *et al.* (1975). Physiological and DNA characterization of *Candida maltosa*, a hydrocarbon utilizing yeast. *Arch Microbiol* 104: 225-231
4. Arie M *et al.* (2000). Phylogenetic identification of n-alkane assimilating *Candida* yeasts based on nucleotide divergence in the 59 end of LSU rDNA gene. *J Gen Appl Microbiol* 46(5): 257-282
5. The yeasts: a taxonomic study. Eds Kurtzman CP *et al.* (2011). 5th edition. Elsevier, London. Volume 1: 1135-1136
6. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. CBS Strain Database (2 september 2014). <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>
7. Buzzini P & Martini A (2000). Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Can J Microbiol* 46(7): 607-611
8. Buzzini P & Martini A (2001). Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med Mycol* 39(6): 479-482
9. Buzzini P & Martini A (2001). Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J Clin Microb* 39(9): 3362-3364
10. COGEM (2013). Advies m.b.t. IAB erkenning *Saccharomyces cerevisiae*. COGEM advies 131029-01
11. Okhuma M *et al.* (1998). Isozyme function of n-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption. *J Biol Chem* 273: 3948-3953
12. Kitamura H *et al.* (1999). Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. *Vet Pathol* 27: 465-466
13. Okhuma M *et al.* (1993). Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. *Biosci Biotech Biochem* 57(10): 1793-1794
14. Pfaller MA *et al.* (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. *PLoS One* 9(7): e101510
15. Omrani AS *et al.* (2014). Ten-year review of invasive *Candida* infections in a tertiary care center in Saudi Arabia. *Saudi Med J* 35(8): 821-826
16. Liu W *et al.* (2014). Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study. *J Antimicrob Chemother* 69(1): 162-167
17. Holzschu DL *et al.* (1979). Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouradia* 17: 71-78
18. Bureau GGO (december 2010). Regeling genetische gemodificeerde organismen. <http://www.ggo-vergunningverlening.nl/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:193514&versionid=&subjectname=>
19. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (29 augustus 2014). <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html>
20. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03

21. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
22. American Type Culture Collection: Fungi and yeast (2 september 2014). [http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Fungi\\_and\\_Yeast.aspx](http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast.aspx)
23. COGEM (2011). Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
24. Hoog de GS *et al.* (2004). Atlas of Clinical Fungi, Atlas version 2004.11. Computer Science II, University of Würzburg, Germany
25. Hazen KC (1995). New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev 8(4): 462-478