

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

DATUM 22 oktober 2014
KENMERK CGM/141022-01
ONDERWERP Advies: classificatie van een bodembacterie afkomstig uit Thailand

Geachte mevrouw Mansveld,

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijzigingsverzoek van vergunning IG 12-032 getiteld 'Onderzoek naar antimicrobiële agentia tegen *Burkholderia pseudomallei*' van de Stichting VU-VUmc.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacteriestam *Burkholderia thailandensis* E264. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met deze bacteriestam.

B. thailandensis E264 is een bodembacterie die in de jaren negentig geïsoleerd is uit een rijstveld in Thailand. De bacterie vertoont grote genetische overeenkomsten met de nauw verwante bacterie *B. pseudomallei* die een ernstige longaandoening kan veroorzaken in de mens.

B. thailandensis E264 wordt in het milieu aangetroffen en is zelden gerapporteerd als veroorzaker van ziekte bij de mens. In twee gevallen is er een infectie met *B. thailandensis* beschreven. Deze infecties hadden geen fatale afloop. Toediening van hoge doseringen in de neus van muizen kan ziekteverwekkend of zelfs dodelijk zijn voor de dieren. Ook blijkt *B. thailandensis* ziekteverwekkend te zijn voor fruitvliegjes.

Op grond van met name het ziekteverwekkend vermogen bij dieren adviseert de COGEM *B. thailandensis* E264 in te delen in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met *B. thailandensis* E264 plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau. De COGEM is van mening dat de geldende werk- en inrichtingsvoorschriften op dit inperkingsniveau afdoende inperking bieden.



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

Classificatie van een bodembacterie afkomstig uit Thailand

COGEM advies CGM/141022-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een wijziging van de vergunning met de titel ‘Onderzoek naar antimicrobiële agentia tegen *Burkholderia pseudomallei*’, ingediend door de Stichting VU-VUmc. De adviesvraag betreft de pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Burkholderia thailandensis* E264 en de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *B. thailandensis*.

De aanvrager wil het GFP gen afkomstig van de kwal *Aequorea victoria* in *B. thailandensis* stam E264 insereren om de effecten van antimicrobiële peptiden op planktonische en in biofilm groeiende bacteriën bestuderen.

B. thailandensis

B. thailandensis E264 is een Gram-negatieve, aerobe, staafvormige bodembacterie, die in de jaren negentig geïsoleerd is uit een bodemmonster afkomstig van een rijstveld in Thailand.¹ De bacterie is nauw verwant aan *Burkholderia pseudomallei* die de ziekte melioidosis veroorzaakt in de mens. Deze ziekte is endemisch in Zuid-Azië, Noord Australië, Zuid- en Centraal Amerika en het Midden Oosten en wordt gekarakteriseerd door ernstige longaandoeningen die uiteindelijk kunnen leiden tot sepsis en de dood.² *B. thailandensis* kan van *B. pseudomallei* worden onderscheiden door zijn vermogen om de monosacharide arabinose om te zetten.³

B. thailandensis kan via open wondjes, inhalatie of orale inname in mensen of dieren terecht komen. In tegenstelling tot *B. pseudomallei* wordt *B. thailandensis* zelden in verband gebracht met pathogeniteit bij de mens. Er zijn tot op heden twee gevallen beschreven waarbij infecties met *B. thailandensis* geassocieerd waren met longontsteking en sepsis zonder fatale gevolgen.^{4,5} Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat de bacterie, afhankelijk van de dosis, ziekmakend dan wel fataal kan zijn voor muizen. Intranasale toediening van 1×10^6 Colony Forming Units (CFU) *B. thailandensis* in de muis bleek even lethaal te zijn als inoculatie met 1×10^3 CFU *B. pseudomallei*.³

Uit een recente publicatie blijkt dat *B. thailandensis* pathogeen is voor de fruitvlieg *Drosophila melanogaster*. Dit komt vermoedelijk door de uitscheiding van een niet nader beschreven toxine. Deze bevinding suggereert volgens de auteurs dat *B. thailandensis* een natuurlijk pathogeen voor ongewervelde dieren zou zijn.⁶

B. thailandensis genoom

Het genoom van *B. thailandensis* is grotendeels vergelijkbaar met dat van *B. pseudomallei*. Het bestaat uit twee circulaire chromosomen die respectievelijk 3,8 en 2,9 megabasenparen (Mb) groot zijn. Het volledige genoom bevat ongeveer 5645 Open reading frames (ORFs).⁷

Het verschil in pathogeniteit tussen *B. pseudomallei* en *B. thailandensis* is vermoedelijk het gevolg van een verschil in virulentiegenen. Het genoom van *B. pseudomallei* bevat bijvoorbeeld twee keer zoveel zogenaamde fimbriae coderende genclusters als *B. thailandensis*.⁷ Fimbriae zijn eiwitstructuren die de bacterie gebruikt om zich aan gastheercellen te hechten. *B. pseudomallei* blijkt zich veel efficiënter aan humane gastheercellen te hechten dan *B. thailandensis*.⁸

Eén van deze genclusters die gelegen is op chromosoom twee in *B. pseudomallei*, codeert voor eiwitten die gelijkenis vertonen met fimbriae eiwitten afkomstig uit *Yersinia* spp. *Yersinia pestis* is de veroorzaker van de pest. Het cluster lijkt via horizontale genoverdracht vanuit *Yersinia* spp in *B. pseudomallei* terechtgekomen te zijn. Dit gencluster is afwezig in *B. thailandensis*.⁷

Andere moleculen die bijdragen aan virulentie zijn oppervlakte-polysachariden en secundaire metabolieten met toxische eigenschappen. *B. pseudomallei* bevat een ander type gencluster dat betrokken is bij de synthese van kapselpolysachariden dan *B. thailandensis*. Hierdoor bezit *B. pseudomallei* een afwijkend kapsel dat hem vermoedelijk in staat stelt om het immuunsysteem van een geïnfecteerde gastheer te omzeilen. Ook bevat het genoom van *B. pseudomallei* genen die coderen voor onder andere vermeende resistentie-eiwitten en effluxpompen die niet aanwezig zijn in *B. thailandensis*.⁷

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil het GFP gen afkomstig van de kwal *Aequorea victoria* in *B. thailandensis* stam E264 inbouwen om de effecten van antimicrobiële peptiden op planktonische en in biofilm groeiende bacteriën bestuderen. De bacteriestam is verkregen van de Mahidol-Oxford Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. De aanvrager wil de werkzaamheden met gg- *B. thailandensis* uitvoeren op op ML-II inperkingsniveau.

Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.⁹ 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. De definities van de eerste drie pathogeniteitsklassen zijn hieronder weergegeven:

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.

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.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over de classificatie van *B. thailandensis*. In 2011 en 2013 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van verschillende andere *Burkholderia* soorten, waaronder *B. pseudomallei*.^{10,11} Deze bacterie is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

Classificatie wereldwijd

De "American Type Culture Collection" beschouwt *B. thailandensis* als een micro-organisme, vallend onder het laagste veiligheidsniveau ("biosafety level 1").¹² Ook in de "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" is *B. thailandensis* in de laagste risicogroep ingedeeld.¹³ Daarbij wordt opgemerkt dat de bacterie in individuele gevallen als pathogeen voor de mens aangemerkt is. De bacterie is nog niet in België, Canada en Groot Brittannië geclassificeerd.

Overweging en advies

Classificatie van B. thailandensis E264

B. thailandensis is een bodembacterie, die nauw verwant is aan de pathogene stam *B. pseudomallei*. De bacterie wordt in het milieu aangetroffen en is zelden gerapporteerd als veroorzaker van ziekte bij de mens. De beschreven ziektegevallen zijn geassocieerd met ernstig trauma of verminderde weerstand.^{4,5}

B. thailandensis kan, afhankelijk van de dosis, ziekmakend dan wel fataal zijn voor muizen. Opgemerkt moet worden dat de dosis waarbij lethale effecten worden aangetroffen 1000 keer zo hoog is vergeleken met de lethale dosis van de verwante en bekende pathogeen *B. pseudomallei*.³ Uit een recente publicatie blijkt dat *B. thailandensis* mogelijk een pathogeen is voor *D. melanogaster* en andere geleedpotigen.

B. thailandensis wordt gezien als modelorganisme voor de bestudering van bepaalde eigenschappen van *B. pseudomallei*.^{3,7} Dit komt ten dele door de grote genomische

overeenkomsten tussen *B. thailandensis* en *B. pseudomallei* en het vergelijkbare ziektebeeld dat *B. thailandensis* veroorzaakt in muizen. De bacterie wordt in de wetenschappelijke literatuur beschouwd als niet-pathogeen voor de mens, waardoor het op een lager inperkingsniveau gehanteerd kan worden dan *B. pseudomallei*.

Op grond van de bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM *B. thailandensis* stam E264 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Inschaling van de werkzaamheden met gg- B. thailandensis

De aanvrager wil GFP tot expressie brengen in de bacteriestam *B. thailandensis* E264. Het GFP is afkomstig is uit de kwal *Aequorea victoria* en wordt al jaren gebruikt als marker in biomedisch wetenschappelijk onderzoek. Op basis van de indeling van *B. thailandensis* E264 in pathogeniteitsklasse 2 en de aard van het markereiwit GFP, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met gg-*B. thailandensis* E264 plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau. De COGEM is van mening dat de geldende werk- en inrichtingsvoorschriften op dit inperkingsniveau afdoende inperking bieden.

Referenties

1. Brett PJ *et al.* (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1: 317-320
2. Kim HS *et al.* (2005). Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics.* 7;6: 174
3. Wiersinga WJ *et al.* (2008). Inflammation patterns induced by different *Burkholderia* species in mice. *Cell. Microbiol.* 10: 81-87
4. Glass MB *et al.* (2006). Pneumonia and Septicemia Caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J.Clin.Microbiol.* 44: 4601-4604
5. Lertpatanasuwan N *et al.* (1999). Arabinose-positive *Burkholderia pseudomallei* infection in humans: case report. *Clin. Infect. Dis.* 28: 927-928
6. Pilátová M & Dionne MS (2012). *Burkholderia thailandensis* is virulent in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 7: e49745
7. Yu Y *et al.* (2006). Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. *BMC Microbiol.* 26: 6-46
8. Kespichayawattana W *et al.* (2004). Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured human epithelial cells. *Microb. Pathog.* 36: 287-292
9. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
10. COGEM (2013). Update van de lijsten met classificaties van bacteriën. COGEM advies CGM/131022-01
11. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
12. ATCC: The Global Bioresource Center (9 oktober 2014) www.lgcstandards-

atcc.org/Products/All/700388.aspx

13. Fachausschuss Chemie, Bundesministerium für Arbeit und Soziales, Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) (9 oktober 2014)
www.baua.de/cae/servlet/contentblob/672886/publicationFile/48583/TRBA-466.pdf