

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijksma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 17 mei 2016
KENMERK CGM/160517-01
ONDERWERP Advies classificatie *Cryptococcus curvatus*

Geachte mevrouw Dijksma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag 'Genetische modificatie van *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509' (IG 16-145) afkomstig van Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is door Bureau ggo gevraagd over de classificatie van de gist *Cryptococcus curvatus* te adviseren. De aanvrager wil werkzaamheden gaan uitvoeren met de stam *C. curvatus* ATCC 20509.

De taxonomie van gisten is complex, en mede door de toenemende informatie over genoomsequenties aan verandering onderhevig. *C. curvatus* wordt al lange tijd in de literatuur beschreven. Recent is op basis van moleculaire fylogenetische analyse aangetoond dat *C. curvatus* twee gistsoorten omvat. Deze soorten zijn *Cutaneotrichosporon curvatus* en *Cutaneotrichosporon oleaginosus* genoemd. De stam ATCC 20509 is daarbij tot referentiestam van de gistsoort *Cut. oleaginosus* benoemd.

Cut. oleaginosus is een apathogene olieproducerende gist en kent een lange historie van veilig gebruik. De COGEM adviseert daarom *Cut. oleaginosus* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat *Cut. oleaginosus* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2 op lijst A1.

Cut. curvatus veroorzaakt infecties bij immuungecompromiteerde patiënten. Het aantal beschreven ziektegevallen is echter beperkt. De COGEM is van mening dat *Cut. curvatus* een opportunistisch pathogeen is. Zij adviseert daarom *Cut. curvatus* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat *Cut. curvatus* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2 op lijst A1.



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

Pathogeniteitsclassificatie *Cutaneotrichosporon oleaginosus* en *Cutaneotrichosporon curvatus*

COGEM advies CGM/160517-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie van de gist *Cryptococcus curvatus* en over de mogelijke plaatsing van deze soort op Bijlage 2 lijst A1. De vergunningaanvrager, de ‘Agrotechnology en Food Sciences Group’ van Stichting DLO (Wageningen UR), wil werkzaamheden met *C. curvatus* ATCC 20509 gaan uitvoeren.

Bijlage 2 lijst A1 maakt deel uit van de ‘Regeling genetisch gemodificeerde organismen’ (Regeling ggo) en bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2 lijst A1 betekent dat met het betreffende micro-organisme onder ML-I laboratoriumcondities ggo’s vervaardigd mogen worden die zijn samengesteld uit vectoren en inserties die voorkomen op de A-lijsten (veilige vectoren en inserties).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico’s voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. 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:

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

Een indeling in *pathogeniteitsklasse 2* is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt,

terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

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

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

Opportunistische pathogenen

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 één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2 lijst A1 geplaatst worden.

3. Gisten

Gisten zijn schimmels (rijk der Fungi). Het merendeel van de schimmels valt binnen de fyta van de Ascomyceten en Basidiomyceten.¹

Gisten planten zich doorgaans ongeslachtelijk voort en zijn in het giststadium ééncellig. De voortplanting vindt plaats door middel van splijting of knopvorming. Bij knopvorming ('budding') stulpt het cytoplasma van de moedercel uit, en vormt het een knop die verder uitgroeit en uiteindelijk afsnoert. Bepaalde gistsoorten vormen daarnaast ook meercellige schimmeldraden (hyfen). Hieruit kunnen arthroconidia of blastoconidia ontstaan wanneer deze zich in individuele cellen opsplitsen.

Sommige gistsoorten kunnen zich niet alleen ongeslachtelijk, maar onder bepaalde omstandigheden ook geslachtelijk via asco- of basidiosporen voortplanten. Omdat de geslachtelijke (teleomorfe) en ongeslachtelijke (anamorfe) stadia er verschillend uitzien, hebben deze gisten in het verleden verschillende soortnamen gekregen. De taxonomie van schimmels (inclusief die van gisten) is daardoor complex, en mede door de toenemende informatie over genoomsequenties aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort.

3.1 Taxonomie van Cryptococcus

De voorliggende adviesvraag betreft de gist *C. curvatus*. Het geslacht *Cryptococcus* behoort binnen het fylum van de Basidiomyceten tot de klasse van de Tremellomyceten. Recent (2015) zijn binnen deze klasse de gisten op basis van een fylogenetische analyse van 7 huishoudgenen opnieuw ingedeeld.² Daarbij is het geslacht *Cryptococcus* geheel herzien. Dit genus omvatte eerst een 100-tal soorten,² maar is nu teruggebracht tot 10.^{2,3,4} De overige 'Cryptococcus' soorten zijn over 25 andere genera verdeeld en hernoemd.²

Eén van deze genera betreft het geslacht *Cutaneotrichosporon*. *C. curvatus* is hierin ondergebracht. De naam bleek echter aan twee verschillende soorten te zijn toegekend. De naam *C. curvatus* is daarom komen te vervallen, en de twee soorten zijn hernoemd tot *Cutaneotrichosporon oleaginosus* en *Cutaneotrichosporon curvatus*. Een nadere beschrijving van deze soorten volgt hieronder.

3.2 *Cut. oleaginosus*

In 2011 is de stam *C. curvatus* ATCC 20509 op basis van moleculaire fylogenetische analyse als een aparte schimmelsoort erkend en tot ‘*Trichosporon oleaginosus*’ hernoemd.⁵ In 2015 is vervolgens op basis van de onder 3.1 besproken fylogenetische analyse de soort hernoemd tot *Cut. oleaginosus*, waarbij ATCC 20509 tot referentiestam is benoemd.² Deze stam is voor het eerst in 1978 beschreven en bij de ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) onder de naam ‘*Candida curvata*’ gedeponeerd.^{5,6,7}

ATCC 20509 en ATCC 20508, de enige andere stam die binnen de soort *Cut. oleaginosus* beschreven is, zijn in staat olie te produceren en daarom onder meer interessant voor de productie van biodiesel. Sinds 1980 zijn er diverse publicaties over de productiekarakteristieken van beide stammen verschenen.^{6,7,8,9}

Van *Cut. oleaginosus* is alleen een ongeslachtelijk stadium bekend. Voortplanting vindt plaats via arthroconidia.⁵

3.3 *Cut. curvatus*

De soort *Cut. curvatus* is in 1942 voor het eerst als ‘*Candida heveanensis* var. *curvata* Diddens & Lodder’ beschreven en heeft sindsdien veel naamsverwisselingen ondergaan.^{10,11} In 1980 is de gist tot *C. curvatus*, en in 2015 tot *Cut. curvatus* hernoemd.^{2,11} De referentiestam voor *Cut. curvatus* is ATCC 10567/ CBS 570. Deze stam is in 1932 geïsoleerd en afkomstig uit het sputum van een tuberculeuze patiënt.¹¹

In de literatuur zijn een beperkt aantal ziektegevallen met *C. curvatus* gerapporteerd.^{12,13,14,15} De infecties die zijn beschreven, betroffen immuun gecompromitteerde patiënten, en daarnaast een koe en een aap. De identiteit van de isolaten die de infecties hebben veroorzaakt, is echter niet onomstotelijk vastgesteld of met moleculaire methoden bevestigd, met uitzondering van de hierboven genoemde stam ATCC 10567/ CBS 570. Deze stam bezit het enzym laccase en kan in lage hoeveelheden melanine produceren.¹⁶ Melanine wordt beschouwd als een marker van pathogeniteit voor opportunistisch pathogene cryptococconen.¹⁶

Van *Cut. curvatus* is alleen een ongeslachtelijk stadium bekend. Voortplanting vindt plaats via blastoconidia.¹⁵

4. Eerder COGEM advies en classificaties andere beoordelende instanties

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over (werkzaamheden met) *C. curvatus*, *Cut. oleaginosus* en *Cut. curvatus*. De ATCC, die haar classificaties baseert op pathogeniteit voor de mens, heeft twee *Cut. curvatus* en twee *Cut. oleaginosus* stammen in haar collectie (resp. ATCC 10567 en 96219, en ATCC 20508 en 20509). Zij heeft de vier stammen ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau (BSL 1).¹⁷ Het Belgische ‘Wetenschappelijke Instituut voor Volksgezondheid’ (WIV-ISP) en het Zwitserse ‘Federal Office of the Environment’ (FOEN) hebben *C. curvatus* als humaan pathogeen ingedeeld in risicoklasse

2.^{18,19} Het is echter niet bekend of het hier de gist *Cut. curvatus* of *Cut. oleaginosus* betreft, en op welke argumenten deze indeling is gebaseerd.

5. 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 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.

De COGEM is gevraagd om de gist *C. curvatus* te classificeren. Er wordt al lange tijd over deze gist gepubliceerd waarbij de naamgeving regelmatig is veranderd. Recent is gebleken dat *C. curvatus* twee gistsoorten omvat waaraan de namen *Cut. oleaginosus* en *Cut. curvatus* zijn toegekend. De COGEM heeft de twee gistsoorten apart geclassificeerd.

5.1 Classificatie *Cut. oleaginosus*

Tot nog toe is van twee giststammen onomstotelijk vastgesteld dat het *Cut. oleaginosus* betreft: ATCC 20508 en ATCC 20509. Beide stammen kennen een lange historie van veilig gebruik. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat deze stammen pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Daarnaast zijn er geen publicaties bekend waarin melding wordt gemaakt dat de stammen toxische of allergene eigenschappen beschikken. De COGEM is daarom van mening dat *Cut. oleaginosus* niet pathogeen is voor mens, dier of plant, en adviseert de gist in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat *Cut. oleaginosus* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2 lijst A1.

5.2 Classificatie *Cut. curvatus*

Het eerste *Cut. curvatus* isolaat dateert uit 1932 en is toen onder een andere naam geregistreerd. Het isolaat fungeert tegenwoordig als de referentiestam voor de soort.

In 1942 is *Cut. curvatus* voor het eerst in de literatuur beschreven, onder de naam ‘*Candida heveanensis* var. *curvata* Diddens & Lodder’. Sinds 1980 worden hierop gelijkende gist-isolaten onder de naam *C. curvatus* in de literatuur vermeld. Het aantal publicaties waarin echter wordt gerapporteerd dat deze gist infecties veroorzaakt, is beperkt, en betreft immuungecompromiteerde patiënten. In een enkel geval zijn er ook dieren betrokken, maar de identiteit van de gist is in die casussen nooit goed bevestigd. Tevens is de ziektegeschiedenis van de betreffende dieren niet duidelijk.

De COGEM merkt op dat recent is aangetoond dat (een deel van) de hierboven benoemde patiënten-isolaten de gistsoort *Cut. curvatus* betreft. Uit de literatuur is echter niet te herleiden welke

gerapporteerde ziektegevallen precies door *Cut. curvatus* zijn veroorzaakt, omdat de identiteit van de betreffende ziekteverwekker niet onomstotelijk is vastgesteld. De enige uitzondering wordt gevormd door de huidige referentiestam die in 1932 uit het sputum van een tuberculeuze patiënt is geïsoleerd (ATCC 10567/ CBS 570).

Aangezien de gerapporteerde ziektegevallen alleen opportunistische infecties betreffen, is de COGEM van mening dat *Cut. curvatus* een opportunistisch pathogeen is. Zij adviseert daarom de gistsoort in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat *Cut. curvatus* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2 lijst A1.

6. Conclusie

De gist die in de literatuur omschreven wordt als *C. curvatus* blijkt de soorten *Cut. curvatus* en *Cut. oleaginosus* te omvatten. Beide soorten zijn al lange tijd bekend, respectievelijk als een humaan opportunistisch pathogeen (*Cut. curvatus*), en een gist met een hoog vetgehalte en een lange historie van veilig gebruik (*Cut. oleaginosus*). De COGEM adviseert *Cut. curvatus* en *Cut. oleaginosus* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2 op lijst A1.

Referenties

1. James TY *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822
2. Liu X-Z *et al.* (2015). Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Stud. Mycol.* 81: 1-26
3. Liu X-Z *et al.* (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology* 81: 85–147
4. Hagen F *et al.* (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78: 16-48
5. Gujjari P *et al.* (2011). Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov.. *Mycologia* 103: 1110-1118
6. Moon NJ *et al.* (1978). Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protein. *J. Dairy Sci.* 61: 1537-1547
7. American Type Culture Collection. All products. Fungi and Yeasts. www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/20509.aspx#history (bezocht 12 mei 2016)
8. Thiru M *et al.* (2011). Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Biores. Technol.* 102: 10436-10440
9. American Type Culture Collection. All products. Fungi and Yeasts. www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/20508.aspx#history (bezocht 12 mei 2016)
10. Index fungorum. www.speciesfungorum.org/GSD/GSDspecies.asp?RecordID=114334 (bezocht 12 mei 2016)
11. MycoBank. International Mycological association. www.mycobank.org/BioLMIICS.aspx?TableKey=1468261600000070&Rec=46509&Fields=All (bezocht 12 mei 2016)

12. Dromer F *et al.* (1995). Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. AIDS 9: 395-408
13. Hoog de GS *et al.* (2004). Atlas of Clinical Fungi, Atlas version 2004.11. Computer Science II, University of Würzburg, Germany
14. Sugita T *et al.* (2000). Phylogenetic and taxonomic heterogeneity of *Cryptococcus humicolus* by analysis of the sequences of the internal transcribed spacer regions and 18S rDNA, and the phylogenetic relationships of *C. humicolus*, *C. curvatus*, and the genus *Trichosporon*. Microbiol. Immunol.
15. Arendrup MC *et al.* (2014). ESCMID/ ECMM guidelines. Clin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl. 3): 76-98
16. Ikeda R *et al.* (2002). Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 40: 1214-1218
17. American Type Culture Collection. All products. Fungi and Yeasts.
www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Fungi_and_Yeast.aspx (bezocht 12 mei 2016)
18. Het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP). Biosafety and Biotechnology Unit (SBB), Belgian Biosafety Server. www.biosafety.be/RA/Class/ClassBEL.html (bezocht 12 mei 2016)
19. Federal Office for the Environment FOEN (2004). Classification of Organisms. Part 4: Fungi.
www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01614/index.html?lang=en (bezocht 12 mei 2016)