

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 28 februari 2018
KENMERK CGM/180228-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Mucor circinelloides f. lusitanicus*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een verzoek van de Technische Universiteit Delft om de schimmel *Mucor circinelloides f. lusitanicus* op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo te plaatsen (IG 17-275_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmel *Mucor circinelloides f. lusitanicus* en de plaatsing van deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene gastheerorganismen) van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'. *Mucor circinelloides f. lusitanicus* is een wereldwijd voorkomende en snelgroeende schimmel die bij voorkeur in een vochtige omgeving groeit. *Mucor circinelloides f. lusitanicus* werd gezien als één van de vier ondersoorten (formae) van de schimmel *Mucor circinelloides*, maar door recente inzichten kan *Mucor circinelloides f. lusitanicus* tot een aparte soort (*Mucor lusitanicus*) gerekend worden.

Infecties veroorzaakt door *Mucor lusitanicus* komen zelden voor en alleen bij patiënten die immuungecompromitteerd zijn of een onderliggend ziektebeeld hebben.

De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat *Mucor lusitanicus* ziekte bij gezonde mensen, dieren of planten veroorzaakt. Daarom is zij van oordeel dat *Mucor lusitanicus* een opportunistisch pathogeen is, en adviseert zij deze schimmel in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat de schimmel in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

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 IenW

Pathogeniteitsclassificatie van de schimmel

Mucor circinelloides f. lusitanicus

COGEM advies CGM/180228-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Technische Universiteit Delft (IG 17-275) is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de schimmel *Mucor circinelloides f. lusitanicus* (Mcl) en plaatsing van deze schimmel op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van gastheerorganismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisicobeoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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, 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 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo)¹ geplaatst worden.

3. *Mucor circinelloides f. lusitanicus*

3.1 Taxonomie

Mucor circinelloides behoort tot de orde *Mucorales* en het genus *Mucor*. Mucorsoorten komen wereldwijd voor, hebben een snelle hyfale groei en produceren veel sporen. De soorten kunnen op veel verschillende substraten groeien, maar geven de voorkeur aan een vochtige omgeving. *M. circinelloides* kent een dimorfe groeivorm en kan onder aerobe omstandigheden als filamenteuze schimmel groeien, onder anaerobe omstandigheden groeit de soort als gist.² De optimale groeitemperatuur van veel Mucorsoorten ligt tussen de 20-25°C, met een luchtvochtigheid van 90-95%.² *M. circinelloides* is thermotoleranter en kan, hoewel langzamer, ook bij 37°C groeien.³

In 1976 zijn drie aan *M. circinelloides* verwante Mucorsoorten (*Mucor lusitanicus*, *Mucor griseocyanus*, en *Mucor janssenii*) op basis van morfologie en interfertilitestesten tot verschillende formae binnen de soort gereduceerd. Hierdoor ontstond het *M. circinelloides* complex, bestaande uit de vier formae *Mucor circinelloides f. lusitanicus* (Mcl), *Mucor circinelloides f. circinelloides* (Mcc), *Mucor circinelloides f. griseocyanus* (Mcg), en *Mucor circinelloides f. janssenii* (Mcj).⁴

De taxonomie van schimmels is complex en mede door de toenemende informatie over genomesequenties aan verandering onderhevig. Dit vraagt om een zorgvuldige identificatie van de te gebruiken schimmelsoort. Ook de taxonomische indeling in het *Mucor* genus is de afgelopen jaren veranderd.⁵ Door toepassing van moleculaire technieken worden in de toekomst meer wijzigingen verwacht. Soms wordt vermeld dat Mcl een synoniem is van *Mucor racemosus*, dit is echter incorrect. *M. racemosus* is een plantpathogene schimmel⁶ die als aparte soort erkend wordt. Ook de uiteensplitsing van de *M. circinelloides* formae is betwist. In 2011 zijn drie klinische isolaten op basis van morfologie en fylogenetische analyses als Mcl geïdentificeerd. Op basis van de resultaten concludeerden de onderzoekers dat Mcl en Mcc als aparte soorten aangemerkt moeten worden (i.e., *M. lusitanicus* en *M. circinelloides*), in plaats van twee formae binnen dezelfde soort.⁷ In een andere studie dat jaar werd gerapporteerd dat er voldoende sequentievariatie in de ITS regio, rDNA2 en RPB1 aanwezig is om de vier formae als subsoorten te classificeren, dat kruisingen voornamelijk binnen de

subsoorten voorkomen, en dat paringen tussen subsoorten tot slechts enkele fertiele combinaties leiden. Op basis van deze analyses werd verondersteld dat de subsoorten mogelijk als aparte soorten aangemerkt kunnen worden.⁸ Uit een studie van 2014 is gebleken dat de verschillen in het genoom en de reproductieve barrières tussen Mcl, Mcg en Mcc (Mcj is niet meegenomen in de analyses) dusdanig groot zijn, dat deze schimmels tot verschillende soorten gerekend kunnen worden.⁹

3.2 Potentiele pathogeniteit

Enkele soorten binnen het genus *Mucor* zijn geassocieerd met ziekte ('mucormycosis') bij mensen. Meldingen van mucormycosis zijn zeldzaam en komen vaak alleen voor bij patiënten met een onderliggend ziektebeeld (met name diabetes mellitus type II) of met een verstoord immuunsysteem.^{3,5} In gevallen waarbij *M. circinelloides* als potentiële ziekteverwekker is geïdentificeerd, is niet altijd vermeld welke formae/(sub)soort erbij betrokken was.

In enkele gevallen is Mcl wel specifiek genoemd in de literatuur. Een casus uit 1990 maakt melding van langzaam ontstane mucormycosis (tijdspanne van 17 jaar) op de hand van een patiënt waarbij *M. lusitanicus* als mogelijke ziekteverwekker werd benoemd. De schimmel was echter alleen op basis van morfologie geïdentificeerd.¹⁰ Mogelijk is de laesie door trauma opgelopen. In een studie in 2011 zijn verschillende *Mucor* sp. isolaten geïdentificeerd op basis van sequentiegegevens en morfologie. Drie *Mucor*soorten geïsoleerd uit bloed, bronchiaal weefsel en dijbeenweefsel zijn geïdentificeerd als zijnde Mcl (*M. lusitanicus*).⁷ De medische achtergrond van de patiënten waarvan de isolaten afkomstig zijn, is niet bekend. In 2013 is Amerika een uitbraak van ziekte geweest door consumptie van yoghurt besmet met *M. circinelloides*. Onderzoekers kwamen tot de conclusie dat de geïsoleerde schimmel genetisch overeen kwam met de Mcc subgroep, en niet zozeer met de Mcl subgroep. Bovendien kon de geïsoleerde schimmel alleen kruisen met een Mcc isolaat, en niet met Mcl of Mcg isolaten.⁹ In 2014 is in India Mcl uit de longen van twee van 71 patiënten met mucormycosis geïsoleerd.¹¹ Alle patiënten hadden een onderliggend ziektebeeld (diabetes, hematologische maligniteiten, COPD of trauma).

4. Eerder COGEM advies

Mcl (synoniem *M. lusitanicus*) is niet eerder door de COGEM geclassificeerd. De COGEM heeft wel de schimmelsoort *Mucor circinelloides* opgenomen in de lijst met pathogene schimmels, en ingedeeld als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2.⁶

5. Classificaties door andere beoordelende instanties

De 'American Type Culture Collection' (ATCC), die pathogeniteit voor de mens in ogenschouw neemt, en het 'Westerdijk Fungal Biodiversity Institute' hebben verschillende Mcl isolaten ingedeeld op BSL-1.^{12,13} De 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAUA), heeft alleen *M. circinelloides* en *M. circinelloides f. janssenii* geclassificeerd, en beide als opportunistisch pathogeen voor gewervelde dieren ingedeeld in risicogroep 1.¹⁴

6. 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 voor handen.

M. circinelloides f. lusitanicus is een veelvoorkomende schimmel. Door recente inzichten wordt Mcl niet meer als formae/subsoort van *M. circinelloides* gezien, maar als een aparte soort (*M. lusitanicus*, Grit Walther, pers. communicatie). Naar verwachting zullen binnen afzienbare tijd alle *M. circinelloides* formae als aparte soort erkend worden. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat Mcl pathogeen is voor gezonde mensen, dieren of planten. In gevallen waarbij *M. circinelloides* in verband is gebracht met ziekte, is niet altijd aangegeven welke formae/(sub)soort hierbij betrokken is. Daarbij is de COGEM van oordeel dat voor een gedegen identificatie fenotypische en moleculaire analyses noodzakelijk zijn.

In zeldzame gevallen waarbij Mcl met zekerheid is geïdentificeerd en met infecties geassocieerd is, betrof het patiënten met een onderliggend ziektebeeld, zoals immuungecompromitteerden. Ook in de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, staan *M. circinelloides* en de 4 (onder)soorten/formae ingedeeld in de laagste risicogroep (RG-1, BSL-1).¹⁵ Tevens staat *M. circinelloides f. lusitanicus* niet vermeld als plantpathogeen in 'online databases' met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.^{16,17,18,19,20,21}

Op basis van gepubliceerde genoomsequenties bevat Mcl genen die mogelijk een rol spelen bij de productie van secundaire metabolieten.⁹ Dit zou een aanwijzing kunnen zijn dat Mucorsoorten tot mycotoxine productie in staat zijn. Er zijn echter in de literatuur tot op heden geen gegevens bekend over de productie van mycotoxines door Mucorsoorten. De COGEM is van oordeel dat de aanwezigheid van deze genen niet betekent dat Mucorsoorten, en in het bijzonder Mcl, daadwerkelijk mycotoxines produceren.

Het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM is van oordeel dat *M. circinelloides f. lusitanicus* als aparte soort beschouwd kan worden (*M. lusitanicus*), en als opportunistisch pathogeen voldoet aan de eerste van de vier genoemde criteria voor indeling in pathogeniteitsklasse 1. Zij adviseert daarom *M. lusitanicus* (*M. circinelloides f. lusitanicus*) in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat de schimmel in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01> (bezoekt: 20 februari 2018)
2. Morin-Sardin S *et al.* (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biol. Rev.* 31: 12-32

3. Ribes JA *et al.* (2000). Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 236–301
4. Schipper MAA (1976). On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud. Mycol.* 12:1-40
5. Walther G *et al.* (2013). DNA barcoding in *Mucorales*: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 30: 11-47
6. COGEM (2014). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/141218-03
7. Álvarez E *et al.* (2011). Two new species of *Mucor* from clinical samples. *Med. Mycol.* 49: 62-72
8. Li CH *et al.* (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 7: e1002086
9. Lee SC *et al.* (2014). Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *MBio.* 5(4): e01390-14
10. Wang JJ *et al.* (1990). A case of cutaneous mucormycosis in Shanghai, China. *Mycoses* 33: 311-315.
11. Chowdhary A *et al.* (2014). Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility of 80 clinical isolates of mucormycetes in Delhi, India. *Mycoses.* 57 Suppl 3: 97-107
12. American Type Culture Collection (ATCC). *Mucor circinelloides f. lusitanicus*. https://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cMucor+circinelloides+f.+lusitanicus%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Mucor+circinelloides+f.+lusitanicus&redir=1 (bezocht: 20 februari 2018)
13. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. *Mucor circinelloides f. lusitanicus*. <http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database> (bezocht: 20 februari 2018)
14. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). *Rhodococcus rhodochrous*. TRBA 466 "Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen". https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-460.pdf;jsessionid=9D7270A13C03F945765A8E95DD7CD9C4.s2t2?_blob=publicationFile&v=2 (bezocht: 20 februari 2018)
15. The Atlas of Clinical Fungi. <http://atlas.clinicalfungi.org/AtlasOnline/>
16. USDA ARS Fungal database. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (bezocht: 21 februari 2018)
17. American Phytopathological Society (APS). www.apsnet.org/SearchCenter/Pages/results.aspx (bezocht: 21 februari 2018)
18. Animal and Plant health Inspection Service (APHIS). www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome (bezocht: 21 februari 2018)
19. Plant-Host Interactions, PHI-base. <http://www.phi-base.org/searchFacet.htm?queryTerm=mucor+circinelloides+f.+lusitanicus> (bezocht: 21 februari 2018)
20. Mycobank. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. www.mycobank.org (bezocht: 21 februari 2018)
21. Q-Bank. Comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases. www.q-bank.eu/Fungi/ (bezocht: 21 februari 2018)