

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

DATUM 13 maart 2018
KENMERK CGM/180313-01
ONDERWERP Advies 'classificatie en inschaling van werkzaamheden met amoebes en gg-Aspergilli'

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld “werkzaamheden met wildtype amoebes in associatie met gg-schimmels (IG 17-280_2.8-000) ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de amoebe *Acanthamoeba castellanii* en de inschaling van werkzaamheden met de amoebes *A. castellanii* en *Dictyostelium discoideum* en de genetisch gemodificeerde (gg-) schimmels *Aspergillus niger* en *Aspergillus fumigatus*.

A. castellanii kan een ontsteking van de hersenen veroorzaken. Deze infectie komt hoofdzakelijk voor bij immuungecompromitteerden en is vrijwel altijd fataal. Ook kan *A. castellanii* bij immunocompetente personen het hoornvlies infecteren wat tot blindheid kan leiden. Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat *A. castellanii* beschouwd moet worden als een klasse 2 pathogeen.

A. niger en *D. discoideum* zijn niet in staat om gezonde personen te infecteren. Werkzaamheden met gg-*A.niger* en *D. discoideum* kunnen daarom uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau.

A. fumigatus en *A. castellanii* zijn klasse 2 pathogenen. Werkzaamheden met deze soorten, al dan niet in combinatie met *D. discoideum* of *A. niger*, dienen daarom uitgevoerd te worden op inperkingsniveau ML-II. Bij de werkzaamheden met gg-schimmels en amoebes worden daarnaast verschillende aanvullende maatregelen geadviseerd. Deze worden in het onderhavige advies verder gespecificeerd.

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden op de hierboven genoemde inperkingsniveaus en met inachtneming van de in het advies gespecificeerde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

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

Classificatie en inschaling van werkzaamheden met amoebes en genetisch gemodificeerde *Aspergilli*

COGEM advies CGM/180313-01

1. Inleiding

De COGEM is naar aanleiding van het 2.8 verzoek van de Universiteit Utrecht getiteld “werkzaamheden met wildtype amoebes in associatie met gg-schimmels (IG 17-280) gevraagd om te adviseren over de classificatie van de amoebe *Acanthamoeba castellanii* en de inschaling van werkzaamheden met deze en een andere amoebe (*Dictyostelium discoideum*) in combinatie met genetisch gemodificeerde (gg-) schimmels (*Aspergillus niger* en *Aspergillus fumigatus*).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (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.

3. *Acanthamoeba castellanii*

A. castellanii is een eencellige eukaryote amoëbe (orde Centramoebidae, subfylum Lobosa, fylum Amoebozoa)⁹ die wereldwijd (van de tropen tot de poolgebieden) voorkomt. De amoëbe kan in diverse omgevingen voorkomen en wordt in hoge aantallen in de bodem,^{1,8} in stofdeeltjes in de lucht, maar ook in vrijwel elk type water (zeewater, drinkwater, zwembaden, douchewater, water in airconditioning etc.) aangetroffen.⁸

Acanthamoeba spp. voeden zich als trofozoiet met bacteriën en dood organisch materiaal. Wanneer voedsel schaars wordt, uitdroging dreigt of onder andere stressvolle omstandigheden, verandert de amoëbe in een cyste.⁵ Cysten kunnen meer dan 20 jaar overleven. Als cyste is de amoëbe resistent tegen ongunstige omstandigheden, zoals uitdroging, verhongering, verschillende chemische stoffen (desinfectia, antimicrobiële middelen) en fysieke omstandigheden (hitte, vorst en UV straling).⁸ Cysten kunnen zich met stofdeeltjes gemakkelijk verspreiden.¹

Wanneer de omstandigheden weer gunstig zijn, wordt de amoëbe geactiveerd en kan deze de cyste verlaten en weer terugkeren naar zijn actieve vorm als trofozoiet.⁵

De amoëbe voedt zich met bacteriën en schimmels en is tevens een reservoir voor verschillende soorten micro-organismen (bacteriën, schimmels en virussen). *A. castellanii* wordt beschouwd als vector voor sommige pathogene micro-organismen (o.a. *Legionella* spp.). Zij kunnen zich in *A. castellanii* vermenigvuldigen. Vanwege de overeenkomsten tussen amoebes en macrofagen in de afweerrespons tegen deze micro-organismen, worden *A. castellanii* en andere amoebes zoals *D. discoideum* gebruikt als modelorganisme.^{2,3}

Mensen komen regelmatig in aanraking met *Acanthamoeba* spp. Een groot deel van de bevolking (85% en 100% in respectievelijk Londen en Nieuw-Zeeland) heeft antilichamen tegen *Acanthamoeba* spp.⁴ *Acanthamoeba* spp. kunnen o.a. infecties veroorzaken van de neus-keelholte en de huid.⁸ *Acanthamoeba* spp. zijn geïsoleerd uit neusslijmvlies van gezonde personen, wat suggereert dat zij de mens via de neus-keelholte binnendringt. Ook kunnen *Acanthamoeba* spp. het lichaam via wondjes in de huid binnendringen. Hierna kan zij zich verspreiden naar het centraal zenuwstelsel, de longen en de hersenen.^{5,8} Daar kan *A. castellanii* granulomateuze amoeben-encefalitis veroorzaken. Dit is een ziekte die vrijwel altijd fataal is en hoofdzakelijk voorkomt bij AIDS-patiënten of immuungecompromitteerde personen. Dit suggereert dat er een verzwakt immuunsysteem nodig is voor het optreden van granulomateuze amoeben-encefalitis.⁴ Er zijn echter ook enkele gevallen beschreven van granulomateuze amoeben-encefalitis bij schijnbaar immuuncompetente personen.⁶

A. castellanii kan ook een niet-opportunistische infectie van het hoornvlies (keratitis) veroorzaken bij immuuncompetente personen. Het optreden van keratitis is geassocieerd met beschadigd hoornvlies. Ook het dragen van contactlenzen is een risicofactor voor het optreden van keratitis, omdat hierbij het epitheel van het hoornvlies licht beschadigd kan raken. Wanneer de contactlenzen vervolgens

gereinigd worden met vloeistof die besmet is met *A. castellanii* kan het hoornvlies geïnfecteerd worden. Keratitis is een pijnlijke infectie die tot blindheid kan leiden.⁵ Keratitis is, ondanks het wijdverspreide voorkomen van *A. castellanii*, zeldzaam maar vanwege het gebruik van contactlenzen en de verbeterde diagnose van oogziekten neemt het aantal gevallen toe.⁷ Keratitis is, mits op tijd ontdekt, goed behandelbaar met een intensieve therapie.^{5,8}

Acanthamoeba spp. kunnen ook bij andere zoogdieren, zoals gorilla's, apen, honden, schapen, runderen, paarden en kangoeroes, maar ook bij vogels, reptielen, amfibieën, vissen en zelfs bij ongewervelden, het centraal zenuwstelsel infecteren.⁵ Experimenten waarbij muizen of apen met *Acanthamoeba* spp. werden geïnoculeerd, leidden tot de dood van de dieren.⁸

Taxonomie

Het indelen van *Acanthamoeba* in soorten gebeurde vroeger op basis van morfologie. Na vergelijking van sequenties van verschillende *Acanthamoeba* stammen blijkt echter dat de naamgeving van de stammen niet overeenkomt met de indeling in sequentietypen.⁹ Vanwege de slechte overeenkomst tussen de eerdere naamgeving en de indeling in sequentietypen zijn sommige onderzoekers van mening dat de huidige soortnamen als ongeldig moeten worden beschouwd en de soorten opnieuw gedefinieerd moeten worden.¹⁰

Bij patiënten met keratitis zijn verschillende *Acanthamoeba* sequentietypen (o.a. T2 t/m T6, T11 en T15) aangetroffen. De typestam van *A. castellanii* behoort tot het T4 sequentietype, dit is het meest voorkomende sequentietype (zowel bij keratitis patiënten, patiënten met granulomateuze amoeben-encefalitis, als in de natuur).^{9,10,7,4}

Classificatie door andere beoordelende instanties

In de Europese richtlijn ter bescherming van werknemers is *A. castellanii* ingedeeld in groep 2.¹¹ Hiertoe behoren agentia die bij de mens ziekte kunnen veroorzaken en een gevaar voor werknemers kunnen opleveren, waarbij het onwaarschijnlijk is dat zij zich onder de bevolking verspreiden, en waarbij gewoonlijk een effectieve profylaxe of behandeling bestaat.

Door de American Type Culture Collection is *A. castellanii* in BSL1 ingedeeld.¹² Tot BSL1 behoren micro-organismen waarvan niet bekend is dat zij ziekten veroorzaken bij gezonde volwassenen.

De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

4. *Aspergillus fumigatus* en *Aspergillus niger*

A. fumigatus is een ziekteverwekker die ernstige infecties kan veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. De schimmelsporen (conidiën) van *A. fumigatus* hebben verschillende eigenschappen die ervoor zorgen dat zij ontsnappen aan macrofagen of de fagocytose overleven. Zo zorgt een hydrofobe laag van eiwitten (de zogenaamde 'rodlet' laag) die de sporen bedekt, ervoor dat de sporen niet door het immuunsysteem herkend worden. De sporen zijn ook bedekt met dihydroxynaphtalene (DHN) melanine wat de immunogeniciteit van de sporen vermindert en ervoor zorgt dat macrofagen de sporen minder gemakkelijk opnemen en doden.¹³ Daarnaast produceert *A.*

fumigatus pyomelanine waarvan verondersteld wordt dat het de schimmel beschermt tegen de afweerreactie van het immuunsysteem.¹⁵

5. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil werkzaamheden uitvoeren met de genetisch gemodificeerde (gg-) schimmels *A. niger* en *A. fumigatus* en de amoebes *D. discoideum* en *A. castellanii*. Zij wil de overleving en ontwikkeling van deze schimmelsoorten in de amoebes bestuderen en daarmee inzicht verkrijgen in de functie van genen die mogelijk een rol spelen bij de interactie tussen de schimmels en macrofagen. Daartoe wil zij o.a. de *rodA*, *rodB*, *pkpP* of *hppD* genen inactiveren. Deze genen zijn betrokken bij de vorming van de 'rodlet' laag (*rodA*), de vorming van DHN melanine (*pkpP*) of de vorming van pyomelanine (*hppD*).^{14,15}

6. Eerdere COGEM adviezen

A. niger en *A. fumigatus* zijn door de COGEM eerder ingedeeld in respectievelijk pathogeniteitsklasse 1 en pathogeniteitsklasse 2.^{16,17} *Dictyostelium* spp. staat in de Regeling ggo vermeld op de lijst met apathogene gastheren.¹⁸

7. Overweging en advies

7.1 Classificatie *A. castellanii*

A. castellanii komt wereldwijd wijdverspreid voor en kan bij immunocompetente mensen het hoornvlies infecteren (keratitis) wat tot blindheid kan leiden. Keratitis is, mits op tijd ontdekt, goed behandelbaar met een intensieve therapie. *A. castellanii* kan ook granulomateuze amoeben-encefalitis veroorzaken. Deze infectie van het centraal zenuwstelsel is vrijwel altijd fataal. Granulomateuze amoeben-encefalitis wordt hoofdzakelijk bij immunogecompromitteerde personen of AIDS-patiënten aangetroffen, maar er zijn ook enkele gevallen van granulomateuze amoeben-encefalitis beschreven bij immunocompetente personen.

Alles overwegende, is de COGEM van oordeel dat *A. castellanii* beschouwd moet worden als een klasse 2 pathogeen.

7.2 Inschaling van werkzaamheden

Incubatie van pathogene schimmelsoorten met amoebes blijkt in sommige gevallen de virulentie van stammen te verhogen. Zo bleek een avirulente *Histoplasma capsulatum* stam in staat om de longen van muizen te infecteren nadat deze samen met *A. castellanii* gekweekt was en werd de virulentie van *Cryptococcus neoformans* voor muizen verhoogd na incubatie met *D. discoideum*.^{19,20} Er zijn geen aanwijzingen dat incubatie van schimmelsoorten met amoebes ertoe leidt dat opportunistische pathogenen gezonde personen kunnen infecteren. Het is daarnaast niet waarschijnlijk dat incubatie met amoebes leidt tot een hogere virulentie dan *in vivo* passages of blootstelling van de schimmels aan macrofagen. De COGEM is daarom van mening dat het niet nodig is om de werkzaamheden met schimmels in combinatie met amoebes op een hoger inperkingsniveau in te schalen.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-*A. niger* en *D. discoideum* op ML-I in te schalen en daarbij de volgende standaard aanvullende voorschriften te hanteren:

- de open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- de kweek vindt plaats in sporendichte containers.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-*A. fumigatus* en *D. discoideum* op ML-II in te schalen en daarbij de volgende standaard aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- de kweek vindt plaats in sporendichte containers;
- tijdens werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-*A. niger* en *A. castellanii* op ML-II in te schalen en daarbij de volgende standaard aanvullende voorschriften te hanteren:

- de open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- de kweek vindt plaats in sporendichte containers.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-*A. fumigatus* en *A. castellanii* op ML-II in te schalen en daarbij de volgende standaard aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- de kweek vindt plaats in sporendichte containers;
- tijdens werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de werkzaamheden op de hierboven genoemde inperkingsniveaus en met inachtneming van de vermelde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd.

De COGEM wijst daarnaast op het volgende. Indien er met hoge concentraties *A. castellanii* wordt gewerkt, kan het raadzaam zijn om maatregelen, - zoals handschoenen, een veiligheidsbril e.d. -, te nemen om medewerkers te beschermen (mede met het oog op de Arboret) door blootstelling aan *A. castellanii* tegen te gaan en daarmee mogelijke infecties door *A. castellanii* (m.n. keratitis) te voorkomen.

Referenties

1. Geisen S *et al.* (2014). *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol. Res.* 113: 3151-3158
2. Clarke M *et al.* (2013). Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 14: R11
3. Van Waeyenberghe L *et al.* (2013). Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. *Environ. Microbiol. Rep.* 5(6): 819-824
4. Siddiqui R & Khan NA (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit. Vectors* 5: 6

5. Visvesvara GS *et al.* (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50: 1-26
6. Das S *et al.* (2016). Central nervous system infection due to *Acanthamoeba*: a case series. Trop. Parasitol. 6(1):88-91
7. Risler A *et al.* (2013). Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. Parasitol. Res. 112: 3807-3816
8. Schuster FL & Visvesvara GS (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int. J. Parasitol. 34: 1001-1027
9. Fuerst PA *et al.* (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. J. Eukaryot. Microbiol. 62: 69-84
10. Fuerst PA (2014). Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. Exp. Parasitol. 145: S39-S45
11. Richtlijn 2000/54/EG van het Europees parlement en de Raad van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen. L262/21-45
12. American Type Culture Collection. *Acanthamoeba castellanii* (Douglas) Page (ATCC® 30234TM). Internet www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/30234.aspx?geo_country=nl
13. Hillmann F *et al.* (2015). Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. Environ. Microbiol. 17(8):2858-2869.
14. Valsecchi I *et al.* (2018). Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. J. Fungi 4(1), 2:1-19
15. Keller S *et al.* (2011). Pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus* requires HmgX and the transcriptional activator HmgR but is dispensable for virulence. PLoS ONE 6(10): e26604
16. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van 13 schimmelsoorten. COGEM advies CGM/170628-02
17. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
18. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 2 Lijst A1. Gastheerorganismen behorende bij combinatie A (lijst met apathogene gastheren). Internet <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2017-01-01#Bijlage2> (bezocht: 7 maart 2018)
19. Steenbergen JN *et al.* (2004). Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. Infect. Immun. 72(6): 3478-3488
20. Steenbergen JN *et al.* (2003). *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. Infect. Immun. 71(9): 4862-4872