

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

DATUM 13 september 2018
KENMERK CGM/180913-01
ONDERWERP Advies classificatie en inschaling werkzaamheden *Mycolicibacterium smegmatis*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Werkzaamheden met *Mycobacterium smegmatis* mc(2) 155 en *Mycobacterium smegmatis* mc(2) 4517 op MLI inperkingsniveau' (IG 18-143_2.8-000) van het Leids Universitair Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde bacteriestammen die afgeleid zijn van *Mycolicibacterium smegmatis* (voorheen *Mycobacterium smegmatis*). De aanvrager is van plan de stammen te modificeren door niet nader gedefinieerde gekarakteriseerde genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten van verschillende '*Mycobacterium*' soorten van pathogeniteitsklasse 1, 2 en 3 in te brengen. In 2011 heeft de COGEM geadviseerd *M. smegmatis* in pathogeniteitsklasse 2 in te delen. De aanvrager is echter van mening dat *M. smegmatis* een micro-organisme van klasse 1 is, en verzoekt de voorgenomen werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau ML-I.


M. smegmatis komt wijd verbreid in de natuur voor. Mens en dier komen veelvuldig met de bacterie in aanraking, maar er is slechts een sporadisch aantal *M. smegmatis* infecties beschreven. Deze treden alleen op bij individuen of dieren met een onderliggend ziektebeeld, of wanneer de eerste verdedigingsbarrière is doorbroken. Er zijn geen aanwijzingen dat infecties worden overgedragen. De COGEM is daarom van oordeel dat *M. smegmatis* een opportunistisch pathogeen is en adviseert de bacterie in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

De COGEM wijst er op dat de aanvrager niet definieert welke 'DNA-replicatie- en DNA-herstelgenen' in de stammen ingebracht zullen worden. Op basis van de huidige inzichten en de informatie van de aanvrager, kan de COGEM op voorhand niet uitsluiten dat er - indien de genen afkomstig zijn van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 en 3 - een toename in pathogeniteit van de opportunistisch pathogeen *M. smegmatis* kan optreden. Omdat de COGEM daarom de risico's voor mens en milieu bij deze werkzaamheden niet verwaarloosbaar klein acht, adviseert zij op grond van het voorzichtigheidsprincipe deze uit te voeren op ML-II niveau. Werkzaamheden waarbij de eerder genoemde genen afkomstig zijn van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, adviseert zij uit te voeren op ML-I niveau. Onder inachtneming van deze inperkingsniveaus, acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Heroverweging pathogeniteitsclassificatie *Mycolicibacterium* (*Mycobacterium*) *smegmatis* en inschaling van werkzaamheden met twee *M. smegmatis* stammen

COGEM advies CGM/180913-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van Het Leids Universitair Medisch Centrum (IG 18-143) is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met de bacteriestammen *Mycolicibacterium* (voorheen *Mycobacterium*) *smegmatis* mc²155 en mc²4517.

M. smegmatis is onder de 'Regeling genetisch gemodificeerde micro-organismen' (Regeling ggo) ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹ De aanvrager is van mening dat, gezien de lange historie van veilig gebruik, bacteriestam mc²155 beschouwd kan worden als een micro-organisme met een geattenuëerd karakter waarmee op het laagste inperkingsniveau gewerkt kan worden. Hij verzoekt daarom werkzaamheden met mc²155 en de daarvan afgeleide stam mc²4517, op het laagste inperkingsniveau (ML-I) uit te voeren. De voorgenomen werkzaamheden betreffen het inbrengen van plasmiden die in het bezit zijn van genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten van verschillende '*Mycobacterium*' soorten (pathogeniteitsklassen 1, 2 en 3).

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 ggo² geplaatst worden.

3. Mycobacteriën

Mycobacteriën zijn zuurvaste staafvormige bacteriën die tot de familie der *Mycobacteriaceae* behoren.^{3,4} Ze beschikken over een dikke celwand met een hoog gehalte aan vetzuren, die bescherming biedt tegen uitdroging, antimicrobiële agentia, hoge temperaturen en lage zuurgraden.⁵ Ook kunnen de bacteriën biofilms vormen.⁶ Mycobacteriën komen overal voor, zoals in de bodem, in stof en in water.^{5,6,7,8} Grofweg kunnen soorten uit het genus *Mycobacterium* onderverdeeld worden in snelgroeiende soorten (bacteriën die minder dan 7 dagen nodig hebben om kolonies te vormen), en langzaam groeiende soorten (bacteriën die meer dan 7 dagen nodig hebben om kolonies te vormen).^{9,10} In het algemeen wordt aangenomen dat pathogene mycobacteriën langzamer groeien en gemiddeld een kleiner genoom hebben dan apathogene mycobacteriën.¹¹

3.1 Taxonomie en indeling mycobacteriën

Op basis van een uitgebreide fylogenetische studie van het genoom is recent voorgesteld het genus *Mycobacterium* onder te verdelen in vijf aparte genera: *Mycobacterium* (behouden voor bekend pathogenen zoals *M. bovis*, *M. leprae* en *M. tuberculosis*), *Mycobacteroides* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov., *Mycolicibacter* gen. nov. en *Mycolicibacterium* gen. nov..¹² Deze indeling is onlangs gepubliceerd in de 'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology' en opgenomen op de internationaal erkende taxonomische 'List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature'.^{3,13} Op grond van de nieuwe indeling is *Mycobacterium smegmatis* hernoemd tot *Mycolicibacterium smegmatis*.

3.2 *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis is voor het eerst in 1889 beschreven en komt wijdverbreid in het milieu voor (bodem en water).^{3,14} In de wetenschappelijke literatuur wordt *M. smegmatis* zowel als niet-pathogeen^{11,15,16} en als (opportunistisch) pathogeen^{17,18,19,20,21,22,23} aangemerkt. De bacterie is enkele malen bij mens en dier (vee, hond, kat) geassocieerd met ernstige infecties van de huid en onderliggend weefsel ten gevolge van onderliggende ziektebeelden ('lipoid pneumonia', 'lymphadenopathy'), trauma, en chirurgische ingrepen,^{17,18,19,20,21,22,23} en eenmaal in verband gebracht met een systemische infectie bij een immuun-gecompromitteerde patiënt.²⁴

3.3 *M. smegmatis* stammen *mc*²155 en *mc*²4517

Wetenschappelijk onderzoek aan pathogene mycobacteriën is lastig omdat zij langzaam groeien. *M. smegmatis* wordt daarom als een aantrekkelijk alternatief modelorganisme beschouwd omdat deze mycobacterie (in verhouding) snel groeit. Het inbrengen van genetisch materiaal in *M. smegmatis* (transformeren) is vanwege zijn dikke celwand en aggregerende eigenschappen echter moeilijk. Er zijn daarom mutanten ontwikkeld die een verhoogde transformatie-efficiëntie kennen, zoals de genetisch gemodificeerde (gg) stam *mc*²155.

*Mc*²155 is afgeleid van wildtype (wt) *M. smegmatis* stam *mc*²6.²⁵ *Mc*²155 bleek geen aggregerende eigenschappen meer te hebben en een 10⁴ tot 10⁵ hogere transformatie-efficiëntie te bezitten ten opzichte van ouderstam *mc*²6.²⁵ Deze veranderde eigenschappen bleken veroorzaakt te worden door een gebrek aan polaire glycolipiden in de celwand.¹⁶

Mutant *mc*²4517 is afgeleid van *mc*²155 en brengt het T7 RNA polymerase tot expressie. Daartoe is een plasmide met een T7 RNA-polymerase expressiecassette, genaamd pYUB1062, in de 'mycobacteriophage attachment site L5' van het genoom van *Mc*²155 geïntegreerd.²⁶

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil niet nader gedefinieerde gekarakteriseerde DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten van verschillende 'Mycobacterium' soorten (pathogeniteitsklassen 1 (onder meer *M. hassiacum* en *M. thermoresistibile*), 2 en 3) aan chemische en fysische analyses onderwerpen. Daartoe wil hij de hiervoor coderende genen met behulp van plasmide pYUB28b inbrengen in de *M. smegmatis* stammen *mc*²155 en *mc*²4517. De aanvrager stelt dat beide stammen een lange historie van veilig gebruik kennen, en heeft daartoe referenties aangevraagd bij onderzoeksgroepen van vier verschillende buitenlandse universiteiten (Verenigd Koninkrijk, de Verenigde Staten en Nieuw Zeeland). Eén van de onderzoeksgroepen geeft aan meer dan 30 jaar op het laagste veiligheidsniveau (biosafety level 1 (BSL1)) met wildtype *M. smegmatis* stammen te werken. Andere onderzoeksgroepen geven aan bijna 30 jaar met stam *mc*²155 en 10 jaar met *mc*²4517 te werken. Er zijn daarbij nooit infecties bij laboratoriumpersoneel of andere complicaties gerapporteerd. De aanvrager is daarom van oordeel dat, gezien de lange historie van veilig gebruik van wildtype *M. smegmatis* en stammen *mc*²155 en *mc*²4517, voorgenomen kloneringswerkzaamheden op ML-I uitgevoerd kunnen worden.

5. Eerdere COGEM adviezen

In 2011 heeft de COGEM geadviseerd *M. smegmatis* in te delen in pathogeniteitsklasse 2.²⁷ Deze classificatie was gebaseerd op een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject.²⁸ Bij dit project werden voor een groot aantal bacteriën de risicogroepindelingen van verschillende internationale beoordelende instanties naast elkaar gelegd. Met betrekking tot *M. smegmatis* was deze indeling niet eenduidig omdat de bacterie zowel in risicogroep 1 als 2 was ingedeeld (zogenaamde controversiële bacterie).^{28,29} Na aanvullend literatuuronderzoek en raadpleging van externe experts is de bacterie op basis van consensus in klasse 2 ingedeeld.²⁸

In 2017 en 2018 heeft de COGEM geadviseerd om *Mycolicibacterium* (voorheen *Mycobacterium*) *neoaureum*, *Mycolicibacterium* (voorheen *Mycobacterium*) *thermoresistibile* en *Mycolicibacterium* (voorheen *Mycobacterium*) *hassiacum* als opportunistisch pathogeen in pathogeniteitsklasse 1 in te delen.^{30,31,32}

6. Classificaties door andere beoordelende instanties

De Duitse 'Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin' (BAuA) die pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft *M. smegmatis* ingedeeld in risicogroep 2.³³ De 'American Type Culture Collection' (ATCC), die eveneens pathogeniteit voor de mens beoordeelt, heeft 49 *M. smegmatis* stammen in haar collectie. Zij adviseert voor 37 stammen, waaronder ATCC 607 (stam mc²6) en ATCC 700084 (stam mc²155), laboratoriumwerkzaamheden uit te voeren op BSL1. Voor de overige 12 stammen adviseert ze werkzaamheden uit te voeren op BSL2.³⁴ De Duitse 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS) en de Belgische 'Dienst Bioveiligheid en Biotechnologie' (SBB), die beiden pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw nemen, hebben *M. smegmatis* ingedeeld in risicogroep 2.^{35,36} Het Zwitserse 'Federal Office for the Environment' (FOEN), die ook de pathogeniteit voor mens, dier en plant in ogenschouw neemt, heeft *M. smegmatis* in risicogroep 1 ingedeeld.³⁷ De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

7. Overwegingen en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met *M. smegmatis* stammen mc²155 en mc²4517. In 2011 heeft de COGEM *M. smegmatis* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Aangezien dit advies enige tijd geleden is uitgebracht, er in de literatuur geen eenduidigheid is over de pathogeniteit van *M. smegmatis*, en voortschrijdend wetenschappelijk inzicht mogelijk een indeling in een andere pathogeniteitsklasse rechtvaardigt, heeft de COGEM de classificatie van *M. smegmatis* opnieuw tegen het licht gehouden. Deze heroverweging en de overwegingen bij de inschaling van de voorgenomen werkzaamheden worden hieronder nader uitgewerkt.

7.1 Heroverweging classificatie *M. smegmatis*

M. smegmatis komt wijd verbreid in de natuur voor. Mens en dier komen veelvuldig met de bacterie in aanraking. Sinds de identificatie van *M. smegmatis* meer dan 100 jaar geleden, is een beperkt aantal infecties bij mens en dier beschreven. Deze sporadische infecties kunnen ernstig van aard zijn, maar

treden alleen op bij individuen of dieren met een onderliggend ziektebeeld, of wanneer de eerste verdedigingsbarrière is doorbroken (trauma, chirurgische ingrepen). Er zijn geen aanwijzingen dat infecties naar andere mensen of dieren worden overgedragen. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *M. smegmatis* een opportunistisch pathogeen is. Zij adviseert daarom de huidige indeling van *M. smegmatis* als micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2 te wijzigen, en de bacterie als opportunistisch pathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1.

7.2 Inschaling werkzaamheden met bacteriestammen mc²155 en mc²4517

De aanvrager is van plan plasmiden met niet nader gedefinieerde gekarakteriseerde genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten van verschillende 'Mycobacterium' soorten van pathogeniteitsklasse 1, 2 en 3 in te brengen in de gg- *M. smegmatis* stammen mc²155 en mc²4517.

De COGEM wijst er op dat onderzoek naar verschillen tussen apathogene mycobacteriën en obligaat pathogene soorten heeft aangetoond, dat de pathogene mycobacteriën beschikken over een grotere natuurlijke variatie in genen die coderen voor enzymen betrokken bij het repareren van DNA-schade (de *recA*, *recB* en *dnaE2* genen) en genen die coderen voor enzymen betrokken bij DNA-replicatie (de *dnaB*, *helz* en *gyrB* genen), dan apathogene mycobacteriën.³⁸ DNA-schade treedt onder meer op wanneer de mycobacteriën in cellen van het immuunsysteem (macrofagen) worden blootgesteld aan reactieve zuurstof- en stikstofverbindingen.³⁸ Het repareren van deze schade draagt bij aan het overleven van de bacterie en daardoor aan zijn virulentie.

Volgens Regeling ggo mogen ggo's met micro-organismen van pathogeniteitsklasse 1 onder ML-I laboratorium restricties vervaardigd worden, indien vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).² De COGEM is van oordeel dat *M. smegmatis* een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 1 is. Zij wijst er op dat de aanvrager niet definieert welke 'DNA-replicatie- en DNA-herstel-genen' (inserties) in stammen mc²155 en mc²4517 ingebracht zullen worden. Op basis van de huidige inzichten in de wetenschappelijke literatuur en de aangeleverde informatie van de aanvrager, kan de COGEM op voorhand niet uitsluiten dat er bij het tot expressie brengen van genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten afkomstig van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 en 3, een toename in pathogeniteit van de opportunistisch pathogeen *M. smegmatis* kan optreden. Omdat de COGEM de risico's voor mens en milieu bij deze kloneringswerkzaamheden daarom niet verwaarloosbaar klein acht, adviseert zij deze op grond van het voorzichtigheidsprincipe uit te voeren op ML-II niveau.

Werkzaamheden waarbij genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten afkomstig van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 worden ingebracht, adviseert zij uit te voeren op ML-I niveau.

8. Conclusie

Samengevat adviseert de COGEM *M. smegmatis* onder de nieuwe naam *Mycolicibacterium smegmatis* als opportunistisch pathogeen in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Kloneringswerkzaamheden in stammen mc²155 en mc²4517 met genen coderend voor DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten afkomstig van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 en 3, adviseert zij in te schalen op ML-II niveau. Kloneringswerkzaamheden in stammen mc²155 en mc²4517 met genen coderend voor

DNA-replicatie- en DNA-hersteleiwitten afkomstig van mycobacteriën ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, adviseert zij in te schalen op ML-I niveau. Indien de voorgenoemde werkzaamheden op deze inperkingsniveaus worden uitgevoerd, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, Bijlage 4. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2018-07-01#Bijlage4> (bezoekt: 3 september 2018)
2. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2018-07-01> (bezoekt: 3 september 2018)
3. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). www.bacterio.net/mycobacterium.html (bezoekt: 4 september 2018)
4. Skerman VBD *et al.* (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 30: 225-420
5. Saier MH (2009). Cell structure chemical composition. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
6. De Groot MA & Huitt G (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 42: 1756-1763
7. Marscheck WJ *et al.* (1972). Microbial degradation of sterols. *App. Microbiol.* 23: 72-77
8. Tsukamura M *et al.* (1983). Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 460-469
9. Wayne LG & GP Kubica (1986). *Mycobacteria*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Sneath PHA (ed.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md
10. Wayne LG & Sramek A (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:1-25
11. Rahman SA *et al.* (2014). Comparative analyses of nonpathogenic, opportunistic, and totally pathogenic mycobacteria reveal genomic and biochemical variabilities and highlight the survival attributes of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio.* 5. doi: 10.1128/mBio.02020-14
12. Gupta RS *et al.* (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus mycobacterium into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front. Microbiol.* 9: 67
13. Ohren A & Garrity G (2018). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 1411-1417
14. Trevisan V (1889). I generi e la specie dell Batteriacee. *Zanaboui e Gabuzzi*: 14
15. Bohsali A *et al.* (2010). The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BMC Microbiol.* 10: 237-249
16. Etienne G *et al.* (2005). The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc2155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiol.* 151: 2075-2086

17. Brown-Elliott BA & Philley JV (2017). Rapidly growing mycobacteria. *Microbiol. Spectr.* 5. doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016.
18. Bercovier H & Vincent V (2001). Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. Jcansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. *Rev. Sci. Tech.* 20: 265-290
19. Brown-Elliott BA & Wallace RJ (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microb. Rev.* 15: 716-746
20. Malik R *et al.* (2000). Infection of the subcutis and skin of cats with rapidly growing mycobacteria: a review of microbiological and clinical findings. *J. Feline Med. Surg.* 2: 350-48
21. Malik R *et al.* (2004). Infections of the subcutis and skin of dogs caused by rapidly growing mycobacteria. *J. Small Anim. Pract.* 45: 485-494
22. Siqueira SM *et al.* (2016). Identification of *Mycobacterium smegmatis* in bovine mastitis. *Acta Scientiae Veterinariae* 44: 166-170
23. Ergan B *et al.* (2004). *Mycobacterium smegmatis* pneumonia. *Respirology* 9: 283-285
24. Pierre-Audigier C *et al.* (1996). Fatal disseminated *Mycobacterium smegmatis* infection in a child with inherited γ interferon receptor deficiency. *Clin. Infect. Dis.* 24: 982-984
25. Snapper SB *et al.* (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4: 1911-1919
26. Wang F *et al.* (2010). *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is not a target relevant to the antitubercular activity of isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 376-3782
27. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
28. Van Belkum (2011). Classification of bacterial pathogens. COGEM onderzoeksrapport CGM 2011-07
29. COGEM (2011). Aanbieding onderzoeksrapport 'Classification of bacterial pathogens'. COGEM aanbiedingsbrief CGM/111220-01
30. COGEM (2017). Pathogeniteitsclassificatie van *Mycobacterium neoaurum*. COGEM advies CGM/170626-01
31. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met de bacterie *Mycobacterium thermoresistibile*. COGEM advies CGM/180530-04
32. COGEM (2018). Pathogeniteitsclassificatie van de bacterie *Mycobacterium hassiacum*. COGEM advies CGM/180613-01
33. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). *Mycobacterium smegmatis*. TRBA 466 'Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen'. www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html (bezocht: 4 september 2018)
34. American Type Culture Collection (ATCC). *Mycobacterium smegmatis*. www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cMycobacterium+smegmatis%7c3%7c,Ny:True,N:1000552-1000577&searchTerms=Mycobacterium+smegmatis&redir=1 (bezocht: 4 september 2018)

35. Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (2013). Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/Organismenliste.html (bezocht: 11 september 2018)
36. Belgian Biosafety Server (2008). List of bacteria and similar organisms presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological risk. www.biosafety.be/sites/default/files/h_a_bacteries.pdf (bezocht: 11 september 2018)
37. Federal Office for the Environment (FOEN). Classification of organisms. Part 1: Bacteria. Status January 2013. www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html (bezocht: 4 september 2018)
38. McGuire AM *et al.* (2012). Comparative analysis of *Mycobacterium* and related *Actinomycetes* yields insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. BMC Gen. 13: 120-147