

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 22 januari 2010  
**KENMERK** CGM/100122-02  
**ONDERWERP** Advies: Inschaling van werkzaamheden met gg-*Candida lusitaniae*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 94-076 met de titel 'Biogenese van Peroxisomen' van het Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Candida lusitaniae*. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over het inperkingsniveau waarop laboratoriumwerkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde (gg-)*C. lusitaniae* stammen ingeschaald dienen te worden. De aanvrager wil de twee gg-*C. lusitaniae* stammen gebruiken als modelorganismen in zijn onderzoek naar genen die betrokken zijn bij de biogenese van peroxisomen. Daartoe zullen in deze stammen op willekeurige wijze mutaties aan worden gebracht met behulp van chemische mutagenese of UV straling. De resulterende mutante gisten die een afwijkende biogenese van peroxisomen laten zien, worden nader onderzocht.

De COGEM kan verspreiding van *C. lusitaniae* onder de bevolking niet uitsluiten. De gistsoort veroorzaakt vooral ziekte in mensen met een verzwakte afweer of met andere ernstige aandoeningen. In deze patiëntengroep is de mortaliteit als gevolg van een infectie van het bloed met *C. lusitaniae* hoog. Over het algemeen zijn *C. lusitaniae* infecties echter goed te behandelen met antimycotica.

De COGEM adviseert de gistsoort *C. lusitaniae* in te delen in pathogeniteitsklasse 2. Gebaseerd op deze indeling kan zij ermee instemmen dat de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met de gg-*C. lusitaniae* stammen op ML-II niveau uitgevoerd worden. Op inperkingsniveau ML-II is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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 large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures.*

# Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Candida lusitaniae*

## COGEM advies CGM/100122-02

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Candida lusitaniae* en de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde (gg-) *C. lusitaniae* stammen. Het betreft hier de stammen JLR609 en JLR610, waaruit het *LEU2* gen met behulp van homologe recombinatie is verwijderd.<sup>1,2</sup> De aanvrager, het Academische Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam wil deze ggo's gebruiken om genen te identificeren die betrokken zijn bij de biogenese van peroxisomen. Daartoe worden deze gg-stammen op willekeurige wijze gemuteerd door middel van chemische mutagenese of UV-straling. De resulterende mutanten zullen fenotypisch geanalyseerd worden op een afwijkende peroxisoomvorming. De aanvrager heeft verzocht de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II inperkingsniveau en zal daarbij handschoenen dragen.

In de Regeling ggo worden 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.<sup>3</sup> Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse.

### *Candida lusitaniae*

De schimmelsoort *C. lusitaniae* is een ascomycete gist die zich zowel geslachtelijk (teleomorf) als ongeslachtelijk (anamorf) kan voortplanten. In het ongeslachtelijke voortplantingsstadium staat deze gist bekend als *C. lusitaniae*, in het geslachtelijke stadium als *Clavispora lusitaniae*. Voor de geslachtelijke voortplanting zijn twee stammen nodig die verschillen in het zogenaamde 'mating type'. Als resultaat van de geslachtelijke voortplanting worden ascosporen gevormd.

De gist *C. lusitaniae* is in 1970 voor het eerst gevonden in het maagdarmlkanaal van warmbloedige dieren.<sup>4</sup> Sindsdien is de soort aangetroffen in mensen met leukemie en in patiënten die behandeld worden met chemotherapie, prednison of een breed-spectrum aan antibiotica.<sup>5</sup> Ook is melding gemaakt van een infectie met *C. lusitaniae* in patiënten die een transplantatie of andere grote operaties hebben ondergaan en in pasgeboren kinderen. De gistsoort is tevens aangetroffen in vruchtensap, rottende bomen en cactussen.<sup>6</sup>

*Candida* soorten kunnen een infectie van het bloed veroorzaken.<sup>7,8</sup> In een beperkt percentage van de gevallen (0.5-1%) is dit ziektebeeld toegeschreven aan *C. lusitaniae*. De mortaliteit als gevolg van een dergelijk infectie door *C. lusitaniae* bedraagt evenwel ruim 40%. Naast een infectie van het bloed is deze gistsoort ook in verband gebracht met botinfectie (osteomyelitis), hersenvliesontsteking (meningitis), buikvliesontsteking (peritonitis) en ontsteking van de

hartkleppen (endocarditis).<sup>9</sup> In de wetenschappelijke literatuur is *C. lusitaniae* tevens geassocieerd met uierontsteking bij koeien.<sup>5</sup> Eventuele infecties met *C. lusitaniae* zijn over het algemeen goed te behandelen met de huidige antimycotica.

In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels wordt *C. lusitaniae* als een opportunistisch pathogeen aangemerkt.<sup>5</sup> Op basis van de pathogeniteit wordt in dit naslagwerk gesuggereerd de werkzaamheden met *C. lusitaniae* op BSL-2 niveau uit te voeren. De *C. lusitaniae* stammen die beschikbaar zijn in de 'American Type Culture Collection' worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>10</sup> In de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' wordt *C. lusitaniae* beschouwd als een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 1.<sup>11</sup>

#### *gg-C. lusitaniae* stammen

De twee genetisch gemodificeerde *C. lusitaniae* stammen waarvan de aanvrager gebruik wil maken, verschillen in het zogenaamde 'mating type'. De stam JLR609 bezit het 'mating type' MAT a en JLR610 bezit het 'mating type' MAT alpha. Hierdoor is geslachtelijke voortplanting tussen beide stammen mogelijk.

De twee stammen zijn ontstaan na deletie van het *LEU2* gen. Hiervoor is gebruik gemaakt van het zogenaamde SAT1 flipper systeem, waardoor het gehele *LEU2* gen uit het genoom van deze mutanten is verwijderd en vervangen door de coderende sequentie van de resistentie marker Nourseothricin van *Streptomyces noursei*.<sup>2</sup> Het *LEU2* genproduct is voor *C. lusitaniae* van belang bij de biosynthese van het aminozuur leucine.

#### **Eerder COGEM advies**

In 2001 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden met twee *Candida* soorten, *C. albicans* en *C. glabrata*.<sup>12</sup> Beide *Candida* soorten zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. In dit advies deelt de COGEM de mening van de aanvrager dat deze *Candida* soorten als opportunistische pathogenen beschouwd kunnen worden. Met het oog op het ziektebeeld dat deze gisten veroorzaken in patiënten met een verminderde immunestatus en het feit dat niet uitgesloten kan worden dat de voorgenomen modificatie tot een verhoging van de pathogeniteit leidt, adviseerde de COGEM destijds de werkzaamheden met de *gg-C. albicans* en *C. glabrata* toch op ML-II inperkingsniveau uit te voeren.

#### **Overweging**

##### *Pathogeniteit van C. lusitaniae*

De COGEM kan niet uitsluiten dat *C. lusitaniae* zich kan verspreiden onder de bevolking, maar de associatie met ziekte acht zij laag. Bovendien zijn *C. lusitaniae* infecties over het algemeen goed te behandelen met antimycotica. De gistsoort infecteert vooral patiënten met een verzwakt immuunsysteem of met andere ernstige aandoeningen. Sinds de ontdekking van deze gistsoort is *C. lusitaniae* in verband gebracht met een aantal klinische ziektebeelden, waaronder een infectie van het bloed. Ten opzichte van *C. albicans* wordt *C. lusitaniae* in beperkte mate als oorzaak van

een dergelijke infectie aangetroffen. De mortaliteit als gevolg van een infectie met *C. lusitaniae* is onder bovengenoemde patiënten echter hoog.

De COGEM merkt op dat de gistsoort *C. lusitaniae* zich geslachtelijk kan voortplanten. Tijdens dit seksuele stadium worden er ascosporen gevormd die kunnen uitgroeien tot gisten met een combinatie van eigenschappen. *C. albicans* is niet in staat tot seksuele reproductie.

#### *Pathogeniteit van gg-C. lusitaniae stammen JLR609 en JLR610*

In de gg-*C. lusitaniae* stammen is het oorspronkelijke *LEU2* gen vervangen door de resistentie marker nourseothricine (SAT1) van *Streptomyces noursei*. Gezien de functie van het *LEU2* en *SAT1* genproduct is de COGEM van mening dat deze stammen geen verhoogde pathogeniteit zullen bezitten. Door de beknopte beschrijving van beide stammen kan zij evenwel niet uitsluiten dat de pathogeniteit vergelijkbaar is met de uitgangsstam.

#### **Advies**

Gezien bovenstaande overweging beschouwt de COGEM *C. lusitaniae* hoofdzakelijk als een opportunistisch pathogeen met echter verstrekkende gevolgen voor een bepaalde groep verzwakte patiënten. De COGEM adviseert deze gistsoort daarom in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Gebaseerd op deze indeling kan zij ermee instemmen dat de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden met de gg-*C. lusitaniae* stammen JLR609 en JLR610 op ML-II niveau uitgevoerd worden. Op dit inperkingsniveau acht de COGEM de risico's van voorgenomen werkzaamheden met de gg-*C. lusitaniae* voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

#### **Referenties**

1. Reedy JL *et al.* (2009). Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *Candida* Pathogenic species complex. *Current Biol.* **19**:891-899
2. Reuss O *et al.* (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**:119-127
3. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. (2004)
4. Uden van N en Buckley H. (1970). *Candida* Berkhout. 893-1087 In: *The Yeast: a taxonomic study* editor: Lodder J, North Holland, Amsterdam, the Netherlands
5. Hoog de GS *et al.* (2009). CD-ROM: Atlas of Clinical Fungi. 3<sup>rd</sup> edition
6. Kurtzman CP en Fell JW (eds) (1998). In: *The Yeasts: a taxonomic study*. 4<sup>th</sup> edition. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands
7. Nguyen MH *et al.* (1996). *Candida lusitaniae*: an important emerging cause of Candidemia. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **5**: 273-278
8. Chen SCA *et al.* (2009). Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**: 662-669
9. Michel RG *et al.* (2009). Prosthetic valve endocarditis caused by *Candida lusitaniae*, an uncommon pathogen: a case report. *J Med. Case Reports* **3**:7611

10. American Type Culture Collection. Internet: <http://www.lgcstandards-atcc.org/> Site bezocht op: (12-01-2010)
11. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Internet: [http://www.dsmz.de/microorganisms/yeast\\_catalogue.php?select=Z](http://www.dsmz.de/microorganisms/yeast_catalogue.php?select=Z) Site bezocht op: (12-01-2010)
12. COGEM (2001). Celwand onderzoek van een aantal micro-organismen. Advies CGM/010322-01

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures.*