

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 7 april 2010
KENMERK CGM/100407-01
ONDERWERP Advies classificatie *Neosartorya fischeri*

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende de classificatie, inschaling en inactivatie van schimmelsoort *Neosartorya fischeri* (IG 05-015/05) adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse *Neosartorya fischeri* ingedeeld dient te worden en over plaatsing van *N. fischeri* op Bijlage 1 van de Regeling GGO. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met *N. fischeri*. Als laatste is de COGEM gevraagd of de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode van gevormde genetisch gemodificeerde (gg) ascosporen als afdoende kan worden beschouwd.

De aanvrager wil deletiemutanten van *N. fischeri* vervaardigen door genen die coderen voor eiwitten betrokken bij stressrespons te verwijderen.

N. fischeri is een schimmelsoort en wordt gekenmerkt door zijn hitteresistente ascosporen. *N. fischeri* is overal aanwezig en komt voor in de bodem en op diverse levensmiddelen. Daarnaast kan *N. fischeri* voedselbederf veroorzaken. De mens komt veelvuldig met *N. fischeri* in aanraking maar de schimmelsoort infecteert zelden mensen. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waaruit blijkt dat *N. fischeri* pathogeen is voor planten of dieren.

De COGEM is van mening dat *N. fischeri* beschouwd dient te worden als opportunistisch pathogeen en adviseert *N. fischeri* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Zij acht het gerechtvaardigd deze schimmelsoort op te nemen in bijlage 1 van de Regeling GGO. Op basis van de overwegingen in dit advies acht de COGEM de risico's van de voorgestelde werkzaamheden met *N. fischeri* verwaarloosbaar klein als deze worden uitgevoerd onder ML-I inperkingsniveau. De COGEM stemt in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om alle open handelingen met gg- *N. fischeri* sporenvormende cultures uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse-II ten einde de kans op verspreiding van gg-ascosporen te minimaliseren. Daarnaast stemt de COGEM in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om tijdens microscopische handelingen buiten fysieke inperking gg- *N. fischeri* ascosporen gehecht aan dekglasjes in vloeistof te houden. Voorts is de COGEM van mening dat de voorgestelde hitte behandeling bij 120°C over een periode van 20 minuten voldoende zal zijn om alle ascosporen te inactiveren.

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

Hoogachtend,



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

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

Classificatie schimmelsoort *Neosartorya fischeri*

COGEM advies CGM/100407-01

Inleiding

De onderhavige adviesvraag betreft een wijzigingsverzoek op de bestaande vergunning van het Centraalbureau voor Schimmelcultures met de titel 'Moleculair genetisch onderzoek aan schimmels en gisten om de biodiversiteit binnen deze groepen beter te begrijpen, als mede de aan deze diversiteit gerelateerde virulentie en gevoeligheid voor antimycotica'. De wijziging betreft de toevoeging van de schimmel *Neosartorya fischeri*. Deze schimmel is in Nederland nog niet eerder als gastheer gebruikt voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen (ggo).

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de schimmelsoort *N. fischeri* ingedeeld dient te worden en over plaatsing van *N. fischeri* op Bijlage 1 van de Regeling GGO.¹ Tevens is haar verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met *N. fischeri*. Als laatste is de COGEM gevraagd of de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode van gevormde genetisch gemodificeerde (gg) ascosporen als afdoende kan worden beschouwd.

N. fischeri

De schimmelsoort *N. fischeri* behoort binnen de *Ascomycota* tot de orde van de *Eurotiales* en de familie van de *Trichocomaceae*. De schimmel is een teleomorph (geslachtelijk stadium) van *Aspergillus fischerianus* en wordt gekenmerkt door zijn hitteresistente ascosporen. *N. fischeri* komt algemeen voor in de bodem, compost en ontbindende vegetatie. Daarnaast wordt *N. fischeri* aangetroffen op leer, papierproducten en voedingsmiddelen zoals rijst, aardappelen, pinda's en fruitsoorten.

De hitteresistente ascosporen veroorzaken in de voedselindustrie voedselbederf zoals bij thermisch behandeld ingeblikt fruit.¹² In de literatuur is melding gemaakt van systemische infecties met *N. fischeri* bij immuungecompromitteerde patiënten. Het betreft twee transplantatie patiënten en een myeloma patiënt.^{2,3,4} Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waaruit blijkt dat *N. fischeri* pathogeen is voor planten of dieren.

Door de ATCC en het Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen wordt gesuggereerd werkzaamheden met *N. fischeri* op BSL-1 niveau uit te voeren^{5,6}. In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, wordt *N. fischeri* als een opportunistische pathogeen aangemerkt.⁷ Op basis van de pathogeniteit wordt in dit naslagwerk gesuggereerd de werkzaamheden met *N. fischeri* op BSL-1 niveau uit te voeren.

gg- *N. fischeri* stam

De aanvrager wil onderzoeken hoe *N. fischeri* zich beschermt tegen verschillende stressoren. Daartoe wil zij deletiemutanten vervaardigen door genen die coderen voor eiwitten betrokken bij stressrespons te verwijderen. Als stam zal *N. fischeri* Stolk en Samson CBS 317.89 gebruikt worden. Deze stam is geïsoleerd uit woestijnzand te Namibië.

De aanvrager geeft aan om alle open handelingen met gg- *N. fischeri* sporenvormende cultures uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse-II ten einde de kans op verspreiding van gg-ascosporen te minimaliseren. Tevens geeft de aanvrager aan dat de vorm en wijze van ontkieming van de gg-*N. fischeri* ascosporen buiten inperkings-niveau door middel van fluorescentie-microscopie bestudeerd zullen worden. Daarbij zullen voor de microscopische analyse de sporen aan dekglasjes gehecht en in vloeistof gehouden worden. De aanvrager verwacht dat de door gg-*N. fischeri* gevormde ascosporen gevoeliger voor stress en daardoor gevoeliger voor hitte zullen zijn.

Inactivatie van ascosporen

N. fischeri wordt gekenmerkt door zijn hitteresistente ascosporen. Deze ascosporen bevinden zich in een sporenzakje (ascus) die zich in gesloten vruchtlichamen (cleistothecia) bevinden. Voordat de sporen vrijkomen lyseren de wanden van de ascus waardoor de ascosporen in de cleistothecia vrijkomen. Als de cleistothecia scheuren komen de ascosporen vrij in het milieu.⁸

Hitteresistentie wordt uitgedrukt in de zogenaamde D-waarde. Deze waarde geeft de tijd aan die nodig is om bij een bepaalde temperatuur 90% van de sporen te doden. In de literatuur wordt voor *N. fischeri* een D_{85} gegeven die maximaal 60 minuten bedraagt.⁹ Dit betekent dat het 60 minuten duurt om bij een temperatuur van 85°C, 90% van de sporen te doden. De D-waarde kan als volgt berekend worden:

$$D_{\text{temperatuur}} = \frac{T}{(\log_{N_0} - \log_N)}$$

Hierbij is T = duur van de verhitting, N_0 = aantal sporen aan het begin van de behandeling, N = aantal sporen dat de behandeling overleeft.

Naast de D-waarde wordt bij berekeningen aan hitteresistentie ook gebruik gemaakt van de z-waarde. Dit getal geeft de verandering aan in temperatuur die nodig is om een tienvoudige vermindering van tijd te realiseren om een bepaald aantal sporen te kunnen inactiveren. In de literatuur wordt voor betreffende *N. fischeri* stam een z-waarde van maximaal 10 gegeven.^{10,11,12} Dit houdt in dat bij een toename van 10 °C in temperatuur een tienvoudige vermindering van de tijd om de hitte te overleven bereikt wordt. De z-waarde kan als volgt berekend worden:

$$z = \frac{(T_2 - T_1)}{(\log D_1 - \log D_2)}$$

Hierbij zijn T_1 en T_2 de temperaturen en zijn D_1 en D_2 de D-waarden behorend bij T_1 en T_2 . Met behulp van deze formules kan berekend worden onder welke tijdsduur en bij welke temperatuur inactivering van een bepaalde hoeveelheid ascosporen van *N. fischeri* plaatsvindt.

De aanvrager geeft aan dat ascosporen geproduceerd door *N. fischeri* afdoende geïnactiveerd worden indien deze gedurende 20 minuten bij 120 °C behandeld zijn.

Regeling GGO: Pathogeniteitsklassen en Bijlage 1

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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen van die klasse. In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij immunocompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immuungecompromiteerde individuen, worden als apathogeen beschouwd.

Aan de Regeling GGO zijn verschillende bijlagen toegevoegd. Bijlage 1 betreft een lijst van micro-organismen die apathogeen voor mens, dier of plant zijn. Bijlage 1 is voor vergunningaanvragers van belang bij de vervaardiging van ggo's omdat met de op deze bijlage geplaatste micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau (ML-I) gewerkt mag worden.

Eerder afgegeven COGEM adviezen

In 2006 heeft de COGEM positief geadviseerd over werkzaamheden met vergelijkbare hitteresistente ascosporen van de schimmelsoort *Talaromyces macrosporus*.¹³ Met inachtneming van aanvullende voorschriften achtte de COGEM de risico's voor mens en milieu van handelingen met *T. macrosporus* verwaarloosbaar klein indien uitgevoerd in een ML-I ruimte. Daarnaast was de COGEM van mening dat de door de aanvrager voorgestelde inactivatiemethode van 20 minuten bij 120°C afdoende was om de hitteresistente ascosporen te inactiveren.

Overweging en advies

Pathogeniteitsklasse indeling en plaatsing op Bijlage 1

N. fischeri komt overal voor, zoals in de bodem en op diverse levensmiddelen als fruit en rijst. De mens komt veelvuldig met *N. fischeri* in aanraking. Echter, de schimmelsoort infecteert zelden mensen. Ze speelt een beperkte rol onder de humaan opportunistische schimmelinfecties. *N. fischeri* infecties zijn te behandelen met een beperkt aantal antimycotica. Er zijn bij de COGEM geen publicaties bekend waaruit blijkt dat *N. fischeri* pathogeen is voor planten of dieren.

De COGEM is van mening dat *N. fischeri* beschouwd dient te worden als opportunistisch pathogeen en adviseert *N. fischeri* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. De COGEM acht het gerechtvaardigd deze schimmelsoort op te nemen in Bijlage 1 van de Regeling GGO.

Inperking

De COGEM acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de vervaardiging van deletie-mutanten uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau. Bij open handelingen met sporen bestaat het risico dat deze in de lucht terecht kunnen komen. De COGEM stemt in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om alle open handelingen met gg- *N. fischeri* sporenvormende cultures uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse-II ten einde de kans op verspreiding van gg- ascosporen te minimaliseren.

Daarnaast stemt de COGEM in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om tijdens microscopische handelingen buiten fysieke inperking gg- *N. fischeri* ascosporen gehecht aan dekglasjes in vloeistof te houden. De COGEM geeft aan dat transport van gg- *N. fischeri* buiten ML-I inperkingsniveau volgens de standaard geldende voorschriften uitgevoerd dient te worden, zoals vastgelegd in bijlage 9 van de Regeling GGO.

Inactivatiemethode

Een inactivatiemethode kan als afdoende worden beschouwd wanneer met de voorgestelde methode alle sporen geïnactiveerd worden.

In de literatuur is de D_{85} voor *N. fischeri* maximaal 60 minuten en de maximale z-waarde 10°C .^{9,12} Volgens deze D_{85} waarde worden bij een temperatuur van 85°C gedurende een uur 90% van de ascosporen van *N. fischeri* geïnactiveerd. Bij een temperatuur van 95°C wordt eenzelfde inactivatie al bereikt na 6 minuten en bij een temperatuur van 115°C al na 3,6 seconden. Door de tijd te verlengen wordt volledige inactivatie behaald. Het zou betekenen dat bij 115°C over een periode van 20 minuten ($N_0 = 10^{(20/0,06)}$) meer dan 10^{333} sporen geïnactiveerd kunnen worden.

Voor de vervaardiging van deletie-mutanten wil de aanvrager een specifieke *N. fischeri* stam gebruiken. De aanvrager toont met experimenten aan dat slechts 1 op de 10.000 sporen (0,01%) van deze *N. fischeri* stam een hitte behandeling bij 85°C gedurende 60 minuten overleeft. De sporen van deze stam lijken daarmee efficiënter geïnactiveerd te worden dan uit bovenstaande literatuur gegevens is afgeleid.

De COGEM is derhalve van mening dat de voorgestelde hitte behandeling bij 120°C over een periode van 20 minuten voldoende zal zijn om alle gg ascosporen te inactiveren.

Advies

Samengevat adviseert de COGEM *N. fischeri* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en acht zij het gerechtvaardigd deze schimmelsoort op te nemen in bijlage 1 van de Regeling GGO. Zij acht het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien voorgenomen werkzaamheden uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau. De COGEM stemt in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om alle open handelingen met gg- *N. fischeri* sporenvormende cultures uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse-II ten einde de kans op verspreiding van gg-ascosporen te minimaliseren.

Daarnaast stemt de COGEM in met het door de aanvrager opgestelde voorschrift om tijdens microscopische handelingen buiten fysieke inperking gg- *N. fischeri* ascosporen gehecht aan dekglasjes in vloeistof te houden. De COGEM is van mening dat de voorgestelde hitte behandeling van 20 minuten bij 120°C voldoende is om door *N. fischeri* geproduceerde gg ascosporen te inactiveren.

Referenties

1. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
2. Lonial *et al.* (1997). *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. Bone Marrow Transplantation 19:753-755

3. Gori *et al.* (1998). Pulmonary aspergillosis caused by *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischerianus*) in a liver transplant recipient. *Journal de mycologie médicale* 8(2): 105-107
4. Chim *et al.* (1998). *Scan. J. of Inf. Dis.* 30(2):190-191
5. American Type Culture Collection (2010-04-01) <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/fungiYeast/fungiYeastIndex.cfm>
6. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2010-04-01) http://www.dsmz.de/microorganisms/fungus_catalogue.php
7. Hoog de GS *et al.* (2009). CD-ROM: Atlas of Clinical Fungi. 3rd edition
8. Carlile M.J. & Watkinson S.C. (1994). *The fungi*. Academic Press, Londen
9. Dijksterhuis J (2007). Heat-resistant ascospores. In: *Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food*. Dijksterhuis J en Samson RA (eds). CRC press, Boca Raton, FL
10. Vinagre Marques da Silva F & Gibbs PA (2009). Principles of thermal processing: pasteurization. In: *Engineering aspects of thermal food processing*. Simpson R (eds). CRC press, Boca Raton, FL
11. Tournas V & Traxler RW (1994). Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. *J. Food Protect.* 57:814-816
12. Girardin *et al.* (1995). Molecular characterization of the Food-Borne fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1378-1383
13. COGEM (2006). *Inschaling Taromyces macrosporus*. Advies CGM/060208-01