

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 april 2021
KENMERK CGM/210429-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *A. persici* en *E. gilvus*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een 2.13 verzoek voor het plaatsen van de bacteriesoorten *Acetobacter persici* en *Enterococcus gilvus* op bijlage 2, lijst A1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) (IG 21-065_2.13-000), ingediend door het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoorten *Acetobacter persici* en *Enterococcus gilvus*.

A. persici is een Gram-negatieve aerobe bacteriesoort en is oorspronkelijk geïsoleerd uit perziken. De bacteriesoort vormt een onderdeel van het microbioom van de fruitvlieg en kan betrokken zijn bij de fermentatie van koffiebonen. Er zijn geen publicaties bekend waarin deze bacteriesoort in verband wordt gebracht met pathogeniteit in mens, dier of plant.

E. gilvus is een Gram-positieve, facultatief anaerobe bacteriesoort oorspronkelijk geïsoleerd uit een patiënt met een ontsteking van de galblaas. Uit hetzelfde patiëntmateriaal zijn tegelijkertijd ook de 'ziekenhuisbacteriën' *Enterococcus faecium*, en *Enterococcus casseliflavus* geïsoleerd. *E. gilvus* is daarnaast aangetroffen in gefermenteerde worsten, kaas en rauwe koeienmelk. Door de aanwezigheid van de andere *Enterococcus*-soorten kan er geen direct verband gelegd worden tussen de aanwezigheid van *E. gilvus* en ziekte bij de mens. Er zijn ook geen andere publicaties bekend waarin deze bacteriesoort in verband wordt gebracht met pathogeniteit in mens, dier of plant.

Alles in overweging nemende adviseert de COGEM om *A. persici* en *E. gilvus* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Beide soorten kunnen worden opgenomen 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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie *Acetobacter persici* en *Enterococcus gilvus*

COGEM advies CGM/210429-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoorten *Acetobacter persici* en *Enterococcus gilvus* (IG 21-065) en de plaatsing van deze bacteriesoorten op Bijlage 2, Lijst A1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo).¹

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.

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 voorhanden.

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.

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, 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 ggo geplaatst worden.¹

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. *Acetobacter persici*

De bacteriesoort *Acetobacter persici* behoort tot de familie van de *Acetobacteraceae*.² Bacteriesoorten uit deze familie zijn bekend als azijnzuurbacteriën, gezien hun vermogen om ethanol om te zetten in azijnzuur. Deze soorten komen voor op o.a. fruit of bloemen, en worden ingezet voor industriële azijnproductie. *A. persici* is een Gram-negatieve aerobe bacteriesoort en is oorspronkelijk geïsoleerd uit perzikvruchten, waarbij deze soort aanvankelijk de naam *Acetobacter persicus* had gekregen.^{2,3} *A. persici* bacteriën zijn niet sporevormend en groeien bij temperaturen tussen 10 en 37°C, met een optimum van 30°C.³ Tevens kan *A. persici*, zoals typerend is voor Acetobacter-bacteriën, groeien in aanwezigheid van ethanol (10%) en hieruit azijnzuur produceren.³

Acetobacter-bacteriën vormen, tezamen met Lactobacillus-soorten, een groot deel van het intestinale microbioom van het modelorganisme *Drosophila melanogaster*, de fruitvlieg.⁴ De bacteriesoort *A. persici* is ook geïsoleerd uit het *D. melanogaster* microbioom, waarbij o.a. de interactie van *A. persici* met het immuunsysteem van de gastheer is onderzocht.^{5,6} Tevens zijn *A. persici* bacteriën aangetroffen als onderdeel van een diverse groep micro-organismen die betrokken zijn bij de fermentatie bij koffiebonen.^{7,8}

4. *Enterococcus gilvus*

Enterococcus soorten zijn Gram-positieve, niet sporevormende, facultatief anaerobe bacteriën die melkzuur produceren en voorkomen in (oppervlakte)water, op planten, gefermenteerde voedselproducten en in het darmstelsel van mensen en dieren. Groei vindt plaats tussen de 10 en 45°C, waarbij het optimum tussen 35 en 37°C ligt.⁹ *Enterococcus* soorten worden beschouwd als commensaal van het menselijke gastro-intestinale stelsel, maar zijn belangrijke ‘ziekenhuisbacteriën’, die in deze setting ziekte veroorzaken zoals bacteriëmie, endocarditis en ontsteking van wonden en de gal- en urinewegen.⁹ De meeste *Enterococcus*-infecties worden veroorzaakt door *Enterococcus faecalis* en *Enterococcus faecium*. *Enterococcus*-soorten zijn vaak resistent tegen verschillende soorten antibiotica en goed in staat nieuwe antibioticumresistentie te verkrijgen.⁹

De bacteriesoort *Enterococcus gilvus* behoort tot het genus *Enterococcus*, familie *Enterococcaceae* en is omstreeks 2000 voor het eerst geïsoleerd uit het gal van een patiënt met cholecystitis.^{2,10} Uit hetzelfde monster zijn tegelijkertijd ook *E. faecium* en *E. casseliflavus* geïsoleerd. *E. gilvus* is daarnaast geïsoleerd uit gefermenteerde worsten, kaas en rauwe koeienmelk.^{11,12,13,14} Op basis van sequentieanalyse is vastgesteld dat *E. gilvus* 99,8% sequentieovereenkomst heeft met *E. raffinosus* en

E. malodoratus.¹⁰ Een SDS-PAGE analyse toonde aan dat minder dan 70% van de eiwitsamenstelling van *E. gilvus* overeen komt met de samenstelling in andere onderzochte Enterococcus-soorten.¹⁰

5. Eerder COGEM advies en classificatie door andere organisaties

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over *A. persici* en *E. gilvus*. Er zijn door de COGEM eerder 16 bacteriesoorten van het *Acetobacter* genus als apathogeen aangemerkt, en 1 soort (*Acetobacter pasteurianus*) is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2 als plantpathogeen. Van het genus *Enterococcus* heeft de COGEM *Enterococcus columbae* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. De soort *Enterococcus raffinosus*, welke 99,8% sequentieovereenkomst vertoont met *E. gilvus*, is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, evenals 11 andere *Enterococcus* soorten.^{10,15}

De Duitse Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) van de Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA) heeft *A. persici* en *E. gilvus* in risicoklasse 1 geplaatst. Wel wordt bij *E. gilvus* de kanttekening geplaatst dat de soort mogelijk pathogeen zou kunnen zijn in individuele gevallen, met name in immuungecompromitteerde patiënten.

6. Overweging en advies

A. persici is een bacteriesoort die voor het eerst geïsoleerd is uit perziken, betrokken kan zijn bij de fermentatie van koffiebonen en ook uit het microbioom van *D. melanogaster* geïsoleerd kan worden.^{3,5,6,7,8} Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen gevallen beschreven waarbij *A. persici* in verband wordt gebracht met ziekte bij mens, dier of plant.

Enterococcus-bacteriesoorten kunnen als commensaal voorkomen bij mensen en dieren. *E. gilvus* kan worden geïsoleerd uit gefermenteerde worsten, kaas en rauwe koeienmelk.^{11,12,13,14} Deze bacteriesoort is oorspronkelijk geïsoleerd uit klinische monsters van een patiënt met cholecystitis.¹⁰ Uit hetzelfde monster is tegelijkertijd ook *E. faecium*, welke samen met *E. faecalis* het grootste gedeelte van de Enterococcus-infecties veroorzaakt, en *E. casseliflavus* geïsoleerd.^{9,10} Hierdoor is er geen duidelijk verband tussen de aanwezigheid van *E. gilvus* en de cholecystitis in deze patiënt. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur, ondanks de aanwezigheid van *E. gilvus* in diverse voedselproducten, geen gevallen beschreven waarbij *E. gilvus* in verband wordt gebracht met ziekte bij mens, dier of plant.

Al het bovenstaande in overweging nemende adviseert de COGEM *A. persici* en *E. gilvus* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Beide soorten kunnen worden opgenomen op bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01> (bezocht: 19 april 2021)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LSPN). <https://lpsn.dsmz.de/> (bezocht: 15-04-2021)

3. Iino T *et al.* (2012). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 235-243
4. Wong AC *et al.* (2017). Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in *Drosophila*. *Curr. Biol* 27: 2397–2404
5. Sekihara S *et al.* (2016). RNA interference directed against the transglutaminase gene triggers dysbiosis of gut microbiota in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 291: 25077–25087
6. Yamauchi T *et al.* (2020). Gut bacterial species distinctively impact host purine metabolites during aging in *Drosophila*. *iScience* 23: 101477
7. Elhalis H *et al.* (2020). The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *Int. J. Food Microbiol.* 333: 108796
8. Elhalis H *et al.* (2020). Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. *Int. J. Food Microbiol.* 321: 108544
9. García-Solache M (2019). The *enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin. Microbiol. Rev.* 32: e00058-18
10. Tyrrell GJ *et al.* (2002). *Enterococcus gilvus* sp. Nov. And *Enterococcus pallens* sp. Nov isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1140-1145
11. Zago M *et al.* (2009). Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Syst. App. Microb.* 32: 514-521
12. Martin B *et al.* (2009). Identification and tracing of *Enterococcus* spp. By RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *J. App. Microb.* 106: 66-77
13. Vrabec M *et al.* (2015). Antibiotic resistance and prevalence of *Enterococcus* spp. And *Escherichia coli* isolated from *Bryndza* cheese. *It. J. An. Sc.* 14 doi: 10.4081/ijas.2015.2968
14. Ohki S *et al.* (2018). Complete genome sequence of carotenoid-producing *Enterococcus gilvus* CR1, isolated from raw cow's milk. *Microb. Res. Ann.* 7: e00988-18
15. COGEM (2018). Advies update taxonomie lijst (a)pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-02