

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 02 juni 2022
KENMERK CGM/220602-02
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Paraburkholderia fungorum*

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Paraburkholderia fungorum' (IG 22-077_2.13-000) van de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Paraburkholderia fungorum*. Paraburkholderia-bacteriën zijn Gramnegatief en komen voornamelijk in de bodem of water voor, of zijn geassocieerd met planten. *P. fungorum* is geïsoleerd uit een witrotschimmelcultuur. Er zijn een viertal publicaties die *P. fungorum* in verband brengen met infecties in de mens. In twee gevallen is *P. fungorum* aangetroffen in patiënten die met meerdere bacteriën geïnfecteerd waren, waardoor de rol van *P. fungorum* moeilijk te beoordelen is. In de meeste gevallen lijkt de bacterie het lichaam te zijn binnengedrongen via een wond, en hadden de patiënten een verzwakte weerstand door infecties of letsels.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. fungorum* ziekte kan veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld. De COGEM is van oordeel dat *P. fungorum* als een opportunistisch pathogeen beschouwd kan worden. De COGEM adviseert daarom *P. fungorum* in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en als zodanig in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo op te nemen.



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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's,
DG Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriesoort *Paraburkholderia fungorum*

COGEM advies CGM/220602-02

1. Inleiding

De COGEM is door Bureau GGO gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriesoort *Paraburkholderia fungorum* (IG 22-077).¹ De Universiteit Leiden verzoekt om vast te stellen dat *P. fungorum* in aanmerking komt voor plaatsing op bijlage 4 van de Regeling ggo (pathogene micro-organismen). De aanvrager geeft aan dat *P. fungorum* als een pathogeniteitsklasse 2 organisme kan worden gezien, maar dat er onduidelijkheid bestaat over de pathogeniteit van deze bacteriën.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling ggo

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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.

Opportunisten

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 ggo geplaatst worden.

3. Het genus *Paraburkholderia*

Het genus *Paraburkholderia* behoort tot de familie van de *Burkholderiaceae*.² *Paraburkholderia*-bacteriën zijn Gramnegatieve staafvormige bacteriën die eerder tot het genus *Burkholderia* behoorden, maar in 2015, onder meer vanwege sequentieverschillen, in het nieuwe genus *Paraburkholderia* zijn ondergebracht.^{3,4} Deze bacteriën komen voornamelijk in de bodem of water voor, of zijn geassocieerd met planten.⁵ Van verschillende *Paraburkholderia*-soorten is bekend dat zij stikstof binden, betrokken zijn bij de vorming van wortelknollen, of de groei van planten stimuleren. Bacteriën uit het *Paraburkholderia*-genus zouden mogelijk toegepast kunnen worden voor biologische bestrijding of bemesting.⁶

4. De soort *Paraburkholderia fungorum*

Paraburkholderia fungorum is een Gramnegatieve en niet-spoorvormende bacteriesoort. De bacterie groeit bij 30°C, tot een maximum van 42°C, en kan groeien in aanwezigheid van 0,5% NaCl.⁷ De type-stam van *P. fungorum* is geïsoleerd van de witrotschimmel *Phanerochaete chrysosporium*, en heeft daar zijn naam aan te danken.⁸ De bacterie en de schimmel zouden mogelijk in symbiose leven. Er zijn stammen van *P. fungorum* geïdentificeerd die bij kunnen dragen aan het herstellen van verontreinigde bodem (bio-remediation).^{9,10} De *P. fungorum* stam BRRh-4 bevordert de groei van aardbeiplanten en zorgt voor een hogere opbrengst van de plant.¹¹ Uit onderzoek naar de symbiose tussen een wantsensoort (*Riptortus clavatus*) en *Burkholderia*-soorten, bleek dat *P. fungorum* een gunstig effect heeft op de groei en ontwikkeling van dit insect.¹² In het verleden zijn verschillende *P. fungorum* stammen ook beschreven als “*Burkholderia cepacia*-achtige stammen”. Andere *P. fungorum* stammen zijn geïsoleerd uit monsters van schimmels, dieren en mensen.⁷

Er zijn verschillende wetenschappelijke publicaties waarin beschreven is dat de bacterie bij mensen is aangetroffen. In twee van deze gevallen zijn geen klinische gegevens vermeld, waardoor niet vast te stellen is of de bacterie ziekteverwekkend is.⁷ In het ene geval is een isolaat aangetroffen in het hersenvocht van een 66-jaar oude vrouw, het tweede geval betreft een isolaat afkomstig uit de vaginale afscheiding van een zwangere vrouw.⁷

Tevens zijn er een aantal publicaties die *P. fungorum* in verband brengen met infecties in de mens. Ten eerste is *P. fungorum* aangetroffen in het bloed van een 9-jarige patiënte met een bacteriële gewrichtsontsteking in haar been.¹³ Met intraveneuze toediening van antibiotica herstelde de patiënt volledig. De jonge patiënt en haar familie hadden geen geschiedenis van reumatoïde artritis of andere auto-immuunziekten, wat kan duiden op een verzwakte weerstand. Ten tweede is *P. fungorum* geïsoleerd

uit een gezonde patiënt met overgewicht.^{14,15} Deze patiënt had al een gescheurde meniscus, en had dezelfde knie beschadigd bij een val waarbij de knie geïnfecteerd raakte. *P. fungorum* werd aangetroffen in het synoviaal weefsel, een dun laagje slijmvlies dat zich aan de binnenzijde van een gewrichtskapsel bevindt. De patiënt herstelde na een antibioticabehandeling. De gevoeligheid voor antibiotica van dit isolaat was vergelijkbaar met het isolaat uit de 9-jarige patiënte.¹³ Een derde publicatie beschrijft een infectieus granuloom¹⁶ De patiënt had vijf jaar eerder een wond opgelopen, en bleef last houden van zwellingen. Uit het gezwel van de patiënt werden meerdere bacteriesoorten geïsoleerd, waaronder *P. fungorum*. De patiënt werd succesvol behandeld met antibiotica. Een vierde publicatie beschrijft de isolatie van *P. fungorum* uit de urine van een patiënt met letsel aan zijn ruggenmerg die daardoor een urineweginfectie had opgelopen.¹⁷

Een analyse van het gehele genoom toont aan dat *P. fungorum* genen bevat die de soort helpen aanpassen en overleven in verschillende omgevingen.¹⁸ Tevens bevat *P. fungorum* genen die eiwitten van verschillende secretiesystemen tot expressie brengen. Aanwezigheid van deze secretiesystemen kan duiden op mogelijk pathogene eigenschappen van een bacterie.¹⁸

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft tot op heden acht *Paraburkholderia*-soorten ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{19,20} Eén daarvan, *Paraburkholderia caryophylli* is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, als plantpathogeen.²¹

6. Classificatie door andere organisaties

De Amerikaanse ATCC heeft *Burkholderia fungorum* aangemerkt als een BSL1 micro-organisme.²² Het Duitse BAUA heeft *P. fungorum* ingedeeld in risicogroep 1.²³

Diverse databases bieden een overzicht van plantpathogene bacteriesoorten. In de database van de 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO) wordt enkel de soort *Paraburkholderia caryophylli* genoemd als plantpathogeen.²⁴ De 'American Phytopathological Society' (APS) noemt enkel de soort *Paraburkholderia andropogonis* pathogeen voor *Sorghum bicolor*.²⁵

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

7. Overweging

Er zijn meerdere casussen die *P. fungorum* in verband brengen met pathogeniteit voor de mens. In twee van de casussen, de patiënt met het infectieuze granuloma¹⁶ en de patiënt met een urineweginfectie¹⁷, werd de aanwezigheid van *P. fungorum* pas na lange tijd aangetoond, te midden van andere bacteriën. Hierdoor is het onduidelijk hoe de infectie ontstaan is. Beide studies maken enkel gebruik van 16S-cDNA-PCR om deze bacterie te identificeren.^{16,17} De twee andere casussen, waarbij in beide gevallen het kniegewricht geïnfecteerd raakte door *P. fungorum*^{13,15}, identificeren *P. fungorum* middels meerdere methoden. In het geval van de 9-jarige patiënte werd dit gedaan middels 16S-cDNA-PCR en aanvullende testen zoals een vetzuur- en eiwitanalyse. In het geval van de patiënt met de gescheurde meniscus, werd er aanvullend op de 16S rDNA sequencing, 'multilocus sequence typing' gecombineerd met fenotypering in kweekcultures.

In de meeste gevallen lijkt de bacterie het lichaam te zijn binnengedrongen via schade aan het lichaam, zoals via een wond door een roosdoorn¹⁶ of via een catheter¹⁷, of na een lang traject van operaties en complicaties.¹⁵ Vermoedelijk hadden de meeste patiënten een verzwakte weerstand, door infecties of letsel, waardoor er sprake kan zijn geweest van een opportunistische infectie door *P. fungorum*.

Er zijn in het genoom geen aanwijzingen die duiden op de productie van toxinen, wel worden verschillende secretiesystemen voorspeld.¹⁸ Echter is de functionaliteit van deze systemen, en of deze een rol spelen in pathogeniteit, niet onderzocht in *P. fungorum*.

In het milieu lijkt *P. fungorum* vooral voor te komen in de bodem en in symbiose met een witrotschimmel.^{8,26} Er zijn bij de COGEM geen literatuur of aanwijzingen bekend waarbij *P. fungorum* in verband wordt gebracht met ziekte in dier of plant.

7. Advies

Al het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. fungorum* ziekte kan veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, en derhalve als een opportunistisch pathogeen beschouwd moet worden. Opportunistische pathogenen worden als niet-pathogeen beschouwd. De COGEM adviseert daarom *P. fungorum* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2022-01-01> (bezocht op 23/0/2022)
2. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Paraburkholderia*
<https://lpsn.dsmz.de/genus/paraburkholderia> (bezocht op 23/05/2022)
3. Sawana A *et al.* (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 5: 429
4. Oren A & Garrity GM (2015). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 65: 2017–2025
5. Dorbritsa AP & Samadpour M (2016). Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2836-2846. DOI: 10.1099/ijsem.0.001065
6. Eberl L & VanDamme P (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000 Research* 5: 1007
7. Coenye T *et al.* (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1099–1107

8. Seigle-Murandi F *et al.* (1996). Bacteria are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2477–2481
9. Khoei NS *et al.* Insights into selenite reduction and biogenesis of elemental selenium nanoparticles by two environmental isolates of *Burkholderia fungorum*. *N. Biotechnol.* 34: 1–11
10. Feng AJ *et al.* (2017). Isolation and characterization of *Burkholderia fungorum* Gan-35 with the outstanding ammonia nitrogen-degrading ability from the tailings of rare-earth-element mines in southern Jiangxi, China. *AMB Express* 7: 140
11. Rahman M *et al.* (2018). Plant probiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. *Sci. Rep.* 8: 2504
12. Itoh H *et al.* (2019). Host-symbiont specificity determined by microbe-microbe competition in an insect gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116: 22673–22682
13. Gerrits GP *et al.* (2005). *Burkholderia fungorum* septicemia. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1115–1117
14. Loong SK *et al.* (2019). Draft genome of *Paraburkholderia fungorum* sequence type 868 recovered from human synovial tissues. *Data in brief.* 25: 104159
15. Loong SK *et al.* (2016). Synovial tissue infection with *Burkholderia fungorum*. *Emerg. Infect. Dis.* 22: 1834–1835
16. Zhang R *et al.* (2014). Infectious granuloma caused by *Burkholderia fungorum* confirmed by laser-capture microdissection and polymerase chain reaction. *Br. J. Dermatol.* 171:1261–1263
17. Nally E *et al.* (2018). Identification of *Burkholderia fungorum* in the urine of an individual with spinal cord injury and augmentation cystoplasty using 16S sequencing: co-pathogen or innocent bystander? *Spinal Cord Ser. Cases* 4: 85
18. Tan KY *et al.* (2020). Comprehensive genome analysis of a pangolin-associated *Paraburkholderia fungorum* provides new insights into its secretion systems and virulence. *PeerJ* 8: e9733
19. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/181112-03
20. COGEM (2019). Pathogeniteitsclassificatie van dertien bacteriesoorten. COGEM advies CGM/190612-01
21. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
22. American Type Culture Collection (ATCC). *Burkholderia fungorum* <https://www.atcc.org/products/baa-463> (bezocht op 20/05/2022)
23. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA) . <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html> (bezocht op 20/05/2022)
24. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) . https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list (bezocht op 23/05/2022)
25. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Sorghum.aspx> (bezocht op 23/05/2022)
26. Compant S *et al.* (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 607–626